Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Biliproteidaggregaten von Cryptophyceen und Rhodophyceen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

ERHARD MÖRSCHEL

aus Laasphe

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Biliproteidaggregaten von Cryptophyceen und Rhodophyceen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
im
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

ERHARD MÖRSCHEL

aus Laasphe

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als
Dissertation angenommen am: 13.12. 1978
Tag der mündlichen Prüfung: 03.01. 1979
Berichterstatter: Prof.Dr.W.Wehrmeyer
Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.Nultsch

Meinen Eltern und meiner Frau
in Dankbarkeit gewidmet

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Wehrmeyer, der die Arbeit betreute und tatkräftig förderte, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG und ZIELSETZUNG	
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Zielsetzung	3
2.	MATERIAL und METHODEN	
2.1.	Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen	5
2.2.	Isolierung der Cryptophyceen-Biliproteide	7
2.2.1.	Zellaufschluß	7
2.2.2.	Reindarstellung der Cryptophyceen-Biliproteide	8
2.2.3.	Trennung der multiplen Biliproteidformen	9
2.3.	Spektroskopische Messungen	12
2.3.1.	Absorptionsspektren	12
2.3.2.	Fluoreszenzemissionsspektren	12
2.4.	Analytische Elektrophoreseverfahren	13
2.4.1.	Isoelektrische Fokussierung, Bestimmung der isoelektrischen Punkte	13
2.4.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
2.4.3.	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese	15
2.4.4.	Harnstoff-Gelelektrophorese	16
2.4.5.	Densitometrie der Elektropherogramme	18
2.5.	Chromatographische Methoden	18
2.5.1.	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie	18
2.5.2.	Präparative Trennung der Biliproteidunter-einheiten durch Ionenaustauscherchromatographie	19
2.6.	Isolation und Reinigung von Phycobilisomen, Phycobilisomendissoziaten, B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin aus *Rhodella violacea*	20
2.6.1.	Isolation und Präparation von Phycobilisomen	21

2.6.2. Isolation und Präparation von Phycobilisomen-dissoziaten 21
2.6.3. Isolation und Präparation von B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin 22
2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 22

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Feinstrukturelle und biochemische Untersuchung der Biliproteide von Chroomonas, Cryptomonas und Hemiselmis (Cryptophyceae) 24
3.1.1. Feinstruktur der Biliproteide von Chroomonas, Cryptomonas und Hemiselmis 24
3.1.2. Biochemische Untersuchung zum Aggregationszustand der Biliproteide von Cryptophyceen 25
3.1.2.1. Isolation der Cryptophyceen-Biliproteide 25
3.1.2.2. Trennung der multiplen Biliproteidformen 27
3.1.2.3. Absorptionsspektren 28
3.1.2.4. Fluoreszenzemissionsspektren 32
3.1.2.5. Elektrophoretisches Verhalten der Cryptophyceen-Biliproteide 37
3.1.2.6. Untereinheitenanalyse durch Harnstoffelektrophorese 40
3.1.2.7. Untereinheitenanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie 42
3.1.2.8. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie 47
3.1.2.9. Molekulargewichtsbestimmung der Biliproteiduntereinheiten durch Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese 49
3.2. Feinstrukturelle Untersuchung an den Biliproteiden von Rhodella violacea (Rhodophyceae) 54
3.2.1. Feinstruktur der Biliproteidaggregate von Rhodella violacea "in situ" 54
3.2.2. Feinstruktur der Biliproteidaggregate von Rhodella violacea "in vitro" 56

3.2.2.1. Phycobilisomen, Isolation und Fixierung 56
3.2.2.2. Phycobilisomen, Feinstruktur und Charakterisierung 59
3.2.3. Dreiereinheiten, Isolation und Charakterisierung 63
3.2.3.1. Isolation und Fixierung 63
3.2.3.2. Feinstruktur und Charakterisierung 66
3.2.4. Phycobilisomenmodell 66
3.2.5. Struktur der Biliproteidaggregate C-Phycocyanin, Allophycocyanin und B-Phycoerythrin 67
3.2.5.1. Aggregate der Dreiereinheiten 67
3.2.5.2. Struktur der isolierten Biliproteidaggregate 69
3.2.6. Molekulargewichtsbestimmung der Einzelaggregate der Dreiereinheit und der gereinigten Biliproteide 75

4. DISKUSSION 78

5. ZUSAMMENFASSUNG 91

6. LITERATURVERZEICHNIS 93

7. TAFELANHANG (Elektronenmikroskopische Abbildungen) 103

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0021

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1. Einleitung

Die Phycobiliproteide sind akzessorische Pigmente bei Cyanobakterien, Rhodophyceen und Cryptophyceen (CHAPMAN, 1973). Als Kollektorpigmente des Photosyntheseapparates nehmen sie die Lichtenergie in einem Spektralbereich auf, der vom Chlorophyll selbst nicht nennenswert absorbiert werden kann und leiten sie zu den Photosystemen weiter (HAXO und BLINKS, 1950).
Wissenschaftliche Untersuchungen an Biliproteiden reichen bis in das Jahr 1836 zurück, als von ESENBECK die Isolierung eines wasserlöslichen blauen Farbstoffes aus Cyanobakterien gelang. Es dauerte jedoch über 50 Jahre, bis MOLISCH (1894) die Proteinnatur der Pigmente nachweisen konnte. LEMBERG und Mitarbeiter klärten in den zwanziger Jahren die Struktur der farbgebenden Gruppe als offenkettiges Tetrapyrrolsystem auf, das den Gallenfarbstoffen der Tiere sehr ähnlich ist (zusammenf. Lit. LEMBERG und LEGGE, 1949). Der rote Chromophor der Biliproteide wurde Phycoerythrobilin, der blaue entsprechend Phycocyanobilin genannt. Neben diesen beiden Chromophoren wurden in jüngerer Zeit weitere Chromophore wie Phycourobilin und Phycobiliviolin beschrieben, deren exakte Struktur noch nicht endgültig aufgeklärt ist (siehe BRYANT et al., 1976).

Bis heute sind vierzehn native Biliproteide bekannt, die in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können: 1. die roten Phycoerythrine, 2. die blauen Phycocyanine, 3. die morphogenetisch wirksamen Phytochrome. Die weitergehende Einteilung der Phycoerythrine und Phycocyanine von Rotalgen und Cyanobakterien ist historisch bedingt; sie werden mit einem Präfix gekennzeichnet, das die Algenklasse nennt, aus der sie zuerst isoliert wurden. Diese Bezeichnungen sind beibehalten worden, gelten jetzt aber für bestimmte Spektraltypen unabhängig von ihrem Vorkommen. Die Biliproteide der Cryptophyceen werden mit dem nachgestellten Hauptabsorptionsmaximum des entsprechenden Pigments gekennzeich-

net (CHAPMAN, 1973).

Die Biliproteide der Cyanobakterien und Rhodophyceen sind hochmolekulare Chromoproteidaggregate, die offensichtlich nach einem einheitlichen Bauprinzip aus zwei meist unterschiedlichen Untereinheiten α und β aufgebaut sind, die einen oder mehrere Chromophore tragen können. Nur B-Phycoerythrin scheint komplexer gebaut zu sein, da es neben den α- und β-Ketten eine weitere konstituierende γ- Untereinheit enthält (GLAZER und HIXSON, 1977).

Die Molekulargewichte der nativen Biliproteidaggregate liegen zwischen 100 000 Dalton für Allophycocyanin, entsprechend einer Struktur von $(\alpha\beta)_3$, und 260 000 bis 290 000 Dalton für R-Phycoerythrin und B-Phycoerythrin der Untereinheitenstruktur $(\alpha\beta)_6$ beziehungsweise $(\alpha\beta)_6\gamma$. C-Phycocyanin zeigt in der Molekulargewichtsanalyse ein ausgeprägtes reversibles Assoziations- und Dissoziationsvermögen; neben hexameren $(\alpha\beta)_6$ und trimeren $(\alpha\beta)_3$ Aggregaten werden protomere $(\alpha\beta)$, dodekamere $(\alpha\beta)_{12}$ und wahrscheinlich höhere Aggregationsstufen gefunden (LEE und BERNS, 1968). Obwohl die Biliproteide der Cryptophyceen sehr wahrscheinlich die gleiche protomere Untereinheitenstruktur besitzen wie die Biliproteide der Rhodophyceen und Cyanobakterien, sind ihre Molekulargewichte doch sehr viel niedriger; sie liegen je nach Literaturangabe zwischen 30 800 und 57 000 Dalton (BROOKS und GANTT, 1973, GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1975).

Diesen Unterschieden in den biochemischen Eigenschaften entsprechen auch Unterschiede in der Lokalisation und Organisation der Biliproteide in der Zelle. Rhodophyceen und Cyanobakterien besitzen mindestens zwei Biliproteide in Form hoch aggregierter Komplexe, den Phycobilisomen, die auf den äußeren Thylakoidoberflächen angeordnet sind (GANTT und CONTI, 1966). Die Cryptophyceen besitzen dagegen wahrscheinlich jeweils nur ein Biliproteid, das nach vorliegenden Untersuchungen intrathylakoidal lokalisiert sein dürfte (DODGE, 1969, WEHRMEYER, 1970, GANTT et al., 1971). Zwei Phycobilisomentypen werden unterschieden:

1. sphärisch gestreckte Phycobilisomen, die bisher nur bei Rotalgen nachgewiesen wurden, und 2. scheibchenförmige Phycobilisomen, die bei Cyanobakterien und Rotalgen vorkommen (WEHRMEYER, 1971, WILDMAN und BOWEN, 1974).

1.2. Zielsetzung

Nachdem die biochemischen Grundlagen des photosynthetischen Elektronentransportes in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden konnten, erlangten die Primärprozesse der Photosynthese wie die Aufnahme der Lichtenergie und ihre Verteilung und Weiterleitung zu den Reaktionszentren besondere Beachtung. Diese Primärprozesse verlangen nach den von FÖRSTER (1951) aufgestellten allgemeinen Bedingungen des Energietransfers eine dichte Packung und eine hochgeordnete und gerichtete Struktur der Reaktionspartner untereinander. Die Strukturanalyse derartiger Chlorophyll-Protein-Lichtsammlerkomplexe von Höheren Pflanzen stößt jedoch auf Schwierigkeiten, da sie als integrale Membranbestandteile durch Detergenzien aus den Thylakoiden herausgelöst werden müssen und dadurch leicht denaturiert werden (THORNBER, 1975). Mit den Biliproteiden liegen bei Rhodophyceen, Cyanobakterien und Cryptophyceen **effektive** Lichtsammlerkomplexe vor, die nicht in den Membranen, sondern an ihren äußeren oder inneren Oberflächen lokalisiert sind. Diese periphere Anordnung erlaubt eine Untersuchung der Biliproteidkomplexe im nativen Zustand.

Erstes Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Untereinheitenstruktur und die Bestimmung der Aggregationsstufen der Cryptophyceen-Biliproteide, die bislang nicht eindeutig erfolgte. Auf der Basis dieser Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die Biliproteide der Cryptophyceen innerhalb der intrathylakoidalen Räume dispers oder in distinkten Mustern angeordnet sind.

Zweites Ziel war die Aufklärung der molekularen Strukturordnung der Phycobilisomen bei Rotalgen, wobei die Phycobilisomen von Rhodella violacea auf Grund ihres scheibchenförmigen Aufbaus für eine molekulare Analyse besonders

geeignet erschienen. Hierbei sollten die räumliche Anordnung der Biliproteide im Phycobilisom und die molekulare Struktur und Aggregationsstufe der konstituierenden Biliproteide untersucht werden.

Erwartet wurden prinzipielle Erkenntnisse über die Organisation biliproteidführender Lichtsammlerpigmentsysteme. Da "in situ" Untersuchungen zur Lösung dieser Ziele nicht ausreichen, sollten Biliproteidkomplexe unter Erhaltung ihrer nativen Struktur isoliert und in kombiniert biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen charakterisiert werden. Dieses Vorgehen hat sich schon bei der Strukturaufklärung von Ribosomen (LAKE, 1976) und Mikrotubuli (BARDELE, 1973) bewährt. Auf Grund der biochemischen und morphologischen Eigenschaften der Biliproteidkomplexe von Rhodophyceen und Cryptophyceen mußte bei den Biliproteiden der Cryptophyceen der Schwerpunkt auf eine biochemische und bei den Biliproteiden der Rhodophyceen auf eine elektronenmikroskopische Charakterisierung gelegt werden.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen

Als Versuchsobjekte dienten die Cryptophyceen Chroomonas spec., Hemiselmis rufescens PARKE (Algenkultursammlung Cambridge, LB 984/1 PARKE, Plymouth "D" marine), Cryptomonas maculata (Marine Biological Laboratory Plymouth, Culture 29, 23.1.1969) und die einzellige Rotalge Rhodella violacea.

Die Anzucht der Cryptophyceen erfolgte sowohl in Standkulturen bei einer Temperatur von 17 °C, als auch in Durchströmungskulturen in Lichtthermostaten bei 20 °C, einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 Stunden und einer mittleren Lichtenergie von 500 bis 1100 Lux. Zur Bestrahlung wurden die Leuchtstoffröhren OSRAM L 40 W 15-1, L 40 W 25-1 und L 40 W 32-1 (Tageslicht, Universalweiß, Warmton de Luxe) benutzt. Die Durchströmungskulturen wurden mit einem Gemisch von 2 % CO_2 in Luft begast.

Die Süßwassercryptomonade Chroomonas spec. wurde in einer Kombination des Chlorella Nährmediums (KESSLER et al., 1957) und des Gloedinium 1 Mediums (v.STOSCH, unveröffentlicht) im Volumensverhältnis 1:3 kultiviert. Das Kulturmedium hatte folgende Zusammensetzung:

1000 ml Kulturlösung enthalten:

KNO_3: 240 mg, NaCl: 118 mg, $NaH_2PO_4 \times H_2O$: 113 mg, $Na_2HPO_4 \times H_2O$: 35 mg, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$: 81 mg, $CaCl_2$: 15 mg, $FeSO_4 \times 7\ H_2O$: 2,7 mg (als EDTA-Komplex).

Spurenelemente:

H_3BO_3: 52,5 µg, $NaMoO_4 \times 2\ H_2O$: 0,42 µg, $CoSO_4 \times 7\ H_2O$: 0,22 µg, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$: 0,44 µg, $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$: 28,92 µg, $MnCl_2 \times 4\ H_2O$: 34,65 µg, LiCl: 0,04 µg, KJ: 0,17 µg, KBr: 0,12 µg, RbCl: 0,12 µg, $SrCl_2 \times 6\ H_2O$: 0,27 µg, $AlCl_3 \times 6\ H_2O$: 0,24 µg.

Vitamine:

Inosit: 0,045 µg, Folsäure: 0,0022 µg, Ca-Pantothenat: 0,0048 µg, Cyanocobalamin: 0,0007 µg, Biotin: 0,061 µg, PAB: 0,0069 µg, Nicotinsäureamid: 0,0012 µg, Rutin: 0,061 µg, Lactoflavin: 0,0038 µg, Ascorbinsäure: 0,018 µg, Thiamin: 0,0085 µg, Pyridoxinhydrochlorid: 0,0103 µg.

Die Meerwassercryptomonaden Cryptomonas maculata und Hemiselmis rufescens wurden in einem modifizierten "ASP" Seewassermedium (PROVASOLI et al., 1957) angezogen, dessen Nährsalzkonzentration erhöht wurde; weiterhin wurde das Nährmedium durch Vitamine ergänzt.

1000 ml Nährlösung enthalten:

NaCl: 3,6 g, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$: 9,0 g, $MgCl_2$: 6,75 g, KCl: 0,9 g, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$: 2,2 g, KNO_3: 0,15 g, K_2HPO_4: 0,03 g.

Spurenelemente:

EDTA (Titriplex III, Merk): 15 mg, $FeSO_4 \times 7\ H_2O$: 0,75 mg, $ZnCl_2$: 1,5 mg, $MnCl_2 \times 4\ H_2O$: 2,1 mg, $CoCl_2 \times 6\ H_2O$: 6,0 mg, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$: 2,25 mg, H_3BO_4: 16,8 mg, $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$: 1,8 mg.

Vitamine:

Thiamin: 17,2 µg, Cyanocobalamin: 12,2 µg, Biotin: 1,4 µg.

Die einzelnen Kulturmedien wurden kurz vor Gebrauch mit den Spurenelementen versetzt und 30 Minuten bei 1 Atm Überdruck autoklaviert; anschließend wurden die mit einem Bakterienfilter (SCHOTT u. Gen., G5) kalt sterilisierten Vitaminlösungen zugegeben.

Die einzellige Rotalge, Rhodella violacea, wurde in dem von KOLLER und WEHRMEYER (1975) modifizierten künstlichen Seewassernährmedium nach JONES et al. (1963) unter den dort angegebenen Kulturbedingungen angezogen, jedoch wurde die Bestrahlung auf 1000 Lux reduziert.

Zur Optimierung der Anzuchtbedingungen der Cryptophyceen wurden die Temperatur und die Bestrahlungsstärke variiert. Anzuchttemperaturen über 22 °C wirkten sich auf die Vermehrung der Kulturen negativ aus. Für die langsam wach-

senden Dauerkulturen waren Temperaturen von 15 - 17 °C optimal, für die schnell wachsenden Massenkulturen zur Pigmentgewinnung 19 - 20 °C. In Bestrahlungsexperimenten mit weißem Mischlicht erwiesen sich die Cryptophyceen als Schwachlichtalgen. Bestrahlungsstärken von 500 - 1000 Lux ergaben Kulturen, die sich gut vermehrten, Bestrahlung mit 1500 bis 2000 Lux bewirkte nach einer kurzen Wachstumsphase ein Absterben der Kulturen. Bei Bestrahlung mit konstanter Lichtenergie blieb das Verhältnis von Chlorophyll zu Biliproteid während der logarithmischen Wachstumsphase konstant. In Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke änderte sich das Chlorophyll-Biliproteidverhältnis, wobei hohe Bestrahlungsstärken eine relative Zunahme des Chlorophylls bewirkten, während eine schwache Bestrahlung eine relative Erhöhung des Biliproteidgehaltes bewirkte.

Unterschiedliche Bestrahlungsstärken beeinflußten nicht nur die relativen Pigmentkonzentrationen, sondern induzierten auch Änderungen des absoluten Pigmentgehaltes. So zeigten "Schwachlichtkulturen" (500 - 1000 Lux) einen im Vergleich zu "Starklichtkulturen" stark erhöhten Pigmentgehalt, wobei Biliproteide überproportional gebildet wurden.

2.2. Isolierung der Cryptophyceen-Biliproteide

2.2.1. Zellaufschluß

Zur Isolierung der Phycocyanine und Phycoerythrine aus Cryptophyceen wurden die Zellen bei 1000 x g (7 Min.) aus dem Nährmedium abzentrifugiert, in 50 - 60 ml 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 resuspendiert und durch Ultraschall (BRANSON SONIFIER, S 125, Energiestufe 8) in einer Rosettzelle bei 4 °C aufgeschlossen; beschallt wurde 3 x 30 Min. mit je 1 Min. Unterbrechung, um ein Ansteigen der Temperatur im Aufschlußgefäß zu vermeiden. Der Aufschluß der Algenzellen und alle folgenden Präparations- und Reinigungsschritte wurden bei 4 - 6 °C in dunklem Grünlicht durchgeführt, um einen Photoabbau der Biliproteide zu vermeiden.

Zur Kontrolle wurden darüberhinaus Zellen sowohl durch

wiederholtes Gefrieren und Auftauen als auch durch Homogenisieren im Mörser mit Seesand aufgeschlossen.

2.2.2. Reindarstellung der Cryptophyceen-Biliproteide

Das Zellhomogenat wurde bei 40 000 x g (30 Min., BECKMAN J 21 B, Rotor JA 20) zentrifugiert, um Zellfragmente, Membranen und Stärke abzutrennen, der grüne Niederschlag verworfen und der blaugrüne biliproteidhaltige Überstand fraktioniert mit Ammoniumsulfat gefällt. Nach 45 %-iger (Gew./Vol.) Sättigung des Überstandes mit Ammoniumsulfat ließ sich thylakoidgebundenes Chlorophyll durch 15 Min. Zentrifugation bei 40 000 x g niederschlagen. In einem zweiten Schritt wurde der Überstand bis zu einer Endkonzentration von 85 % (Gew./Vol.) Ammoniumsulfat versetzt, um die Biliproteide selbst auszufällen. Nach einer Reifung von mindestens drei Stunden konnten die gefällten Biliproteide zur weiteren Reinigung abzentrifugiert werden (35 000 x g, 20 Min.). Unter 85 % (Gew./Vol.) Ammoniumsulfat in der Kälte blieben die Biliproteidfraktionen über einen längeren Zeitraum unverändert.

Zur weiteren Reinigung wurden die ausgefällten, abzentrifugierten Biliproteide in ca. 10 - 20 ml Sörensen-Puffer 0,03 M, pH 7,0 resuspendiert und an SEPHADEX G 100 (100 x 3,5 cm Säule, Gelbettvolumen 865 cm^3, Durchfluß 23 ml/Std.) mit dem gleichen Puffer chromatographiert. Die Elutionsprofile der Trennungen wurden mit einem Durchflußspektralphotometer bei 280 nm registriert, das Eluat in Fraktionen gesammelt und spektralphotometrisch vermessen (Phycocyanin-645: 280, 584, 645 nm, Phycoerythrin-545: 280, 545 nm, Phycoerythrin-555: 280, 555 nm). Fraktionen, deren Absorptionsverhältnis von Hauptmaximum/280 nm größer als 4 war, wurden gesammelt und vereinigt.

Wenn es nötig war, erfolgte eine Anreicherung der Biliproteidlösungen in AMICON-Ultrafiltrationszellen mit DIAFLO-Membranen (Amicon B.V., Niederlande, Filter Type PM 10) oder in Ultrahülsen (SARTORIUS Membranfilter GmbH, Göttingen, Hülsentype SM 13200). Wegen ihrer geringen Tendenz zur Adsorption von Biliproteiden waren die Kollodi-

umhülsen der Type SM 13 200 stets den DIAFLO-Membranen PM 10 vorzuziehen, die nur zum Einengen und Ankonzentrieren großer Volumina benutzt wurden.

Phycocyanin-645 aus Chroomonas spec. wurde durch Ammoniumsulfatgradientenelution in Abwandlung des von KING (1972) vorgeschlagenen Verfahrens weiter gereinigt. Das in 0,03 M Sörensen Puffer, pH 7,0, gelöste Pigment wurde langsam mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 85 % (Gew./Vol.) gesättigt; gleichzeitig wurde CELITE 545 (JOHNS-MANVILLE Corp., Vertrieb SERVA, Heidelberg), das Adsorptionsmittel, in die Lösung eingerührt. Nach der vollständigen Adsorption von Phycocyanin, wurde die Suspension in eine Säule (20 x 3,5 cm) gegossen, mit 85 % (Gew./Vol.) Ammoniumsulfat in 0,03 M Sörensen-Puffer, pH 7,0 äquilibriert und gewaschen und anschließend mit einem linearen absteigenden Ammoniumsulfatgradienten (85 % bis 0 %) in Startpuffer entwickelt. Als Gradientenbildner diente das Gradientenmischgerät ULTROGRAD (LKB Produkter, Schweden). Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 550 ml, der Konzentrationsabfall an Ammoniumsulfat 0,15 %/ml. Die Phycocyaninfraktionen wurden vereinigt, gegen 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 dialysiert oder an SEPHADEX G 25 (PHARMACIA, Schweden), mit Sörensen-Puffer als Elutionsmedium, entsalzt.

Bei der Reinigung von Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas maculata und Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis rufescens wurde auf die Ammoniumsulfatgradientenelution verzichtet.

2.2.3. Trennung der multiplen Biliproteidformen

Phycocyanin-645, Phycoerythrin-555 und Phycoerythrin-545 wurden nach Fraktionierung an **SEPHADEX** G 100 gegen 1 % Glycin dialysiert und einer halbpräparativen isoelektrischen Fokussierung in Saccharosedichtegradienten unterworfen, die zugleich der Reinigung, der Auftrennung der multiplen Biliproteidformen und der Bestimmung der isoelektrischen Punkte diente.

Tabelle 1: Versuchsbedingungen der isoelektrischen Fokussierungen.

Biliproteid	PC-645	PE-545	PE-555
Vortrennung			
pH-Bereich	3,5 - 10	3,5 - 10	3,5 - 10
Anfangs-/Endspannung	150/350 V	150/350 V	150/350 V
Versuchsdauer	48 Std.	48 Std.	48 Std.
Anodenpuffer	0,2 ml 1 % Phosphorsäure, 20 ml H_2O dest.		
Kathodenpuffer	0,2 g NaOH (0,4 ml Äthanolamin), 12 g Saccharose, 14 ml H_2O dest.		
Feintrennung			
pH-Bereich	5,0 - 8,0	4,5 - 5,5 7,4 - 8,4	
Anfangs-/Endspannung	300-600 V	400-1200 V	
Versuchsdauer	72 Std.	72 Std.	
Anodenpuffer	15 ml 1 N Essigsäure, (12 g Saccharose)		
Kathodenpuffer	0,4 ml Äthanolamin, 14 ml H_2O dest., (12 g Saccharose)		

Die Trennversuche wurden mit der Elektrofokussierausrüstung der Firma LKB (Schweden) durchgeführt, die aus Elektrofokussiersäule 110 ml, Gradientenmischer mit Rührmotor und ausgleichendem Konus, Gleichstromnetzgerät (0 - 1200 V) und Fraktionensammler mit Durchflußphotometer bestand.

Die Fokussierung von Phycocyanin-645 und Phycoerythrin-545 erfolgte in zwei Stufen (Tabelle 1). Die Vortrennungen erfolgten mit erhöhten Ampholytkonzentrationen von 4 % in dem Bereich von pH 3,5 - 10. Nach Fokussierung der Banden wurden die Säulen eluiert, die interessierenden pH-Bereiche gesammelt und in gespreizten Gradienten erneut fokussiert, und zwar die Phycoerythrinfraktionen in den Bereichen von pH 4,5 - 5,5 und von pH 7,8 - 8,4, Phycocyanin im pH-Bereich von 5,0 - 8,0. Die Ampholytlösungen wurden von LKB bezogen (AMPHOLINE pH 3,5 - 10, pH 5,0 - 8,0). Gewöhnlich wurde die Elektrodenpolarität so gewählt, daß die Kathode am unteren Säulenende anlag; nur bei Fokussierung im Bereich pH 4,5 - 5,5 wurde die Kathode an das obere Säulenende angelegt.

Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis rufescens konnte nur einmal elektrofokussiert werden da nur geringe Pigmentmengen zur Verfügung standen.

Die Versuche wurden bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Nach Beendigung der Trennung erfolgte die Elution der Säule durch hydrostatischen Druck. Fraktionen von 1,5 - 2,0 ml wurden gesammelt und ihre pH-Werte sofort bei einer Temperatur von 4 °C bestimmt. Die optische Dichte der einzelnen Fraktionen wurde im PMQ II Spektralphotometer (ZEISS) gemessen. Reine Biliproteidfraktionen wurden vereinigt und in Kollodiumhülsen (Type SM 13 200, SARTORIUS Membranfilter GmbH, Göttingen) im Unterdruck gegen 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 ankonzentriert. Die Entfernung von Zucker und Ampholyten erfolgte durch Gelfiltration an SEPHADEX G 50 (25 x 1,5 cm Säule, Durchfluß 35 ml/Std.). Die Reinheit der einzelnen Biliproteidfraktionen wurde in der analytischen Gelelektrophorese oder der analytischen Gelelektrofokussie-

rung überprüft.

2.3. Spektroskopische Messungen

2.3.1. Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren von klaren Pigmentextrakten, gereinigten Biliproteiden, Biliproteidaggregaten und Phycobilisomen wurden in 1 cm Quarzküvetten bei einer konstanten Bandbreite von 0,2 oder 0,4 nm in einem ZEISS DMR 10 Spektralphotometer aufgenommen; Zellsuspensionen mit starker Lichtstreuung wurden in einem SHIMADZU PM 5000 Spektralphotometer vermessen. Extinktionsmessungen bei definierten Wellenlängen erfolgten mit einem ZEISS PMQ II Spektralphotometer.

2.3.2. Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenzemissionsspektren der Phycoerythrine wurden mit einem SHIMADZU RF-502 Fluorometer aufgenommen, das mit einem Hamamatzu Photomultiplier R 446 und einer elektronischen Spektrenkorrektureinrichtung ausgerüstet war. Die Messung der Fluoreszenzemissionsspektren von Phycocyanin-645 und lebender Cryptophyceen erfolgte in einem Eigenbau-Reflexionsfluorometer (Fachbereich Physikalische Chemie, Philipps-Universität Marburg), das durch Ausrüstung mit einem Lock-In-Amplifier (Mod. 401, BRACKNELL, England) und einem rotlichtempfindlichen Photomultiplier (EMI 9659 B mit S 20 Kathode) für Fluoreszenzmessungen im langwelligen Bereich des Spektrums besonders geeignet war. Anregungslicht 2. Ordnung wurde durch einen Sperrfilter OG 530 (3 cm Dicke, SCHOTT u. Gen., Mainz) ausgeschaltet. Die Spektren mußten anhand von Eichwerten korrigiert und anschließend normiert werden. Die Fluoreszenzanregung von Phycocyanin-645 erfolgte bei 456 und 579 nm; Phycoerythrin-545 wurde bei 510, 544 und 548 nm angeregt, Phycoerythrin-555 bei 530 und 548 nm. Die gereinigten Biliproteide wurden bei Zimmertemperatur in 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 gemessen, die lebenden Cryptophyceen blieben während der Messung in Kul-

turlösung.

2.4. Analytische Elektrophoreseverfahren

2.4.1. Isoelektrische Fokussierung, Bestimmung der isoelektrischen Punkte.

Die isoelektrischen Punkte der Biliproteide wurden sowohl durch Elektrofokussierung in Saccharosegradienten mit geringen Biliproteidkonzentrationen (ca. 1 mg) als auch durch analytische Elektrofokussierung in Polyacrylamidgelen bestimmt.

Die Elektrofokussierungen in Gelen wurden in Abwandlung der von WRIGLEY (1968) beschriebenen Methode durchgeführt. Zur Fokussierung wurden Ampholyte des Bereiches pH 3,5 - 10 benutzt, die Ampholytkonzentration der Gele betrug 1 % (Gew./Vol.). Die Gele enthielten 6 % Acrylamid, das Verhältnis Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug 37:1. Zur Verbesserung der Gelkonsistenz und der Linearität der pH-Gradienten wurde bei einigen Versuchen 10 % Glycerin (Vol./Vol.) oder Saccharose (Gew./Vol.) zugegeben. Die Polymerisation der Gele erfolgte mit Ammoniumperoxodisulfat; 0,1 % Phosphorsäure und 0,1 % Äthanolamin dienten als Anolyt und Katholyt.

Proben von 10 µl - 60 µl, die mit 10 % Saccharose versetzt waren, wurden auf die Gele aufgetragen und zum Schutz mit verdünnter Ampholinelösung überschichtet (0,5 ml Ampholine pH 3,5 - 10, 1 g Zucker, 20 ml Wasser). Die isoelektrischen Fokussierungen erfolgten 1 Std. bei 100 V (1 mA/Röhrchen) und 2 Std. bei 200 - 300 V bis zur Konstanz des Stromdurchflusses. In Kontrollexperimenten wurden die Biliproteidproben nach Vorfokussierung zur Formierung der pH-Gradienten unter die Ampholinelösung geschichtet. Die Gele wurden nach Beendigung der Experimente in Anlehnung an die von VESTERBERG (1971) beschriebene Methode sofort fixiert und gefärbt.

Gelansatz für 10 Röhrchen (8 cm Länge, 5 mm Innendurchmesser):

Acrylamidlösung	4,5 ml	(0,64 g N,N'-Methylenbisacrylamid, 24 g Acrylamid mit Wasser zu 100 ml, filtern.)
TEMED	1,2 ml	(1 ml TEMED mit Wasser zu 100 ml)
Ampholine 40 %	0,45 ml	
Ammoniumpersulfat	12,3 ml	(50 mg Ammoniumpersulfat in 164 ml Wasser, täglich frisch ansetzen)

Färbebad: 1 - 3 Std. in 0,025 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250 in 75 ml Methanol, 185 ml Wasser, 9 g Sulfosalicylsäure, 30 g Trichloressigsäure.

Entfärbebad: 250 ml Äthanol, 650 ml Wasser, 80 ml Eisessig. Entfärbebad mehrmals wechseln.

2.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einer von STEGEMANN (1970) beschriebenen Flachgelelektrophoreseapparatur durchgeführt. Die Geldicke betrug 3 mm, als Puffersystem diente ein Tris-Borat-Puffer, 0,03 M, pH 7,9 (STEGEMANN et al., 1973). Dieses System erwies sich anderen Puffern, wie Phosphatpuffer pH 7,1, Tris-Glycin-Puffer pH 8,3 und Tris-Borat-Puffer pH 8,9, die ebenfalls getestet wurden, als überlegen. Die Gele enthielten 5 %, 7,5 % oder 10 % Acrylamid, das Verhältnis Acrylamid zu N,N'-methylenbisacrylamid betrug gewöhnlich 19:1, bei 10 % Gelen jedoch nur 30:1.

Die Biliproteidproben in 0,03 M Tris-Borat-Puffer wurden mit 10 % Saccharose beschwert und mit Bromphenolblau als Marker versetzt; 5 bis 35 µl Protein wurden pro Trog mit einer geeichten Plastikkapillare appliziert. Die Anreicherung der Proteine zur Elektrophorese fand in Kollodiumhülsen oder im Dialyseschlauch (Typ 20/32 SERVA, Heidelberg)

gegen Polyäthylenglycoll 20 000 statt. Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und einer Stromstärke von 40 - 50 mA. Unmittelbar nach Elektrophorese wurden die Gele 1 - 3 Stunden in einer 0,025 %-igen Lösung von Coomassie-Brilliant-Blau G 250 angefärbt; Entfärbung durch Diffussion erfolgte nach Abspülen der Gele mit Wasser in einer Lösung aus Methanol, Wasser und Eisessig. Das Entfärbebad wurde mehrmals gewechselt.

Gelansatz zur Elektrophorese:

140	ml Acrylamidlösung	(7,1 g Acrylamid, 0,375 g Bisacrylamid, zu 150 ml in Puffer lösen)
50	mg Natriumsulfit	(wasserfrei)
0,35	ml Diaminopropionitril	
2,8	ml Ammoniumpersulfatlösung	(2 % in Wasser)

Färbelösung

200	ml Lösungsmittel	(60 g Trichloressigsäure, 800 ml Wasser, 200 ml Methanol, 70 ml Eisessig)
5	ml	1 % Coomassie-Brilliant-Blau Lösung in Wasser

Entfärber — 3000 ml Methanol, 7000 ml Wasser, 500 ml Eisessig.

2.4.3. Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese erfolgte in Abwandlung des von SHAPIRO et al. (1967) vorgeschlagenen Verfahrens nach den Vorschriften von KONIG et al. (1970). Die Elektrophoresen wurden mit unterschiedlichen Gelkonzentrationen von 5 %, 7,5 % und 10 % Acrylamid durchgeführt, die Vernetzungsverhältnisse von Acrylamid zu N.N'-methylenbisacrylamid betrugen 19:1 oder 37:1. Elektrophorese erfolgte bei 5 °C, 65 mA und ca. 140 V in 3 mm starken Flachgelen. Die Laufstrecken, auf Bromphenolblau als Marker bezogen, betrugen 10 cm. Als Eichsubstanzen für die Molekulargewichtsbestimmung wurden die gleichen Proteine benutzt,

die auch zur Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration dienten, nur Cytochrom c (12 400 Dalton) wurde von SERVA bezogen.

Unmittelbar vor Elektrophorese wurden die Biliproteide und Referenzproteine nach WEBER et al. (1972) entweder 2 Stunden bei 40 °C oder 1 bis 5 Minuten bei 100 °C im Glycerinbad inkubiert. Als Inkubationsmedium diente ein 0,025 M Natriumphosphatpuffer pH 7,1, der 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 % 2-Mercaptoäthanol enthielt. In Kontrollexperimenten wurde 2-Mercaptoäthanol weggelassen. Die Proteinkonzentration bei Inkubation betrug bis zu 0,5 mg/ml. Je 50 µl der inkubierten und rasch abgekühlten Proteinlösungen wurden mit 5 µl 2-Mercaptoäthanol, 5 µl Bromphenolblau (0,05 % in Wasser) und 40 µl 0,025 M Natriumphosphatpuffer versetzt und anschließend mit 10 % Saccharose beschwert. Auf eine Dialyse nach Inkubation wurde verzichtet. Probevolumina von 5 µl - 30 µl wurden zur Elektrophorese eingesetzt. Die Gelplatten wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau G 250 gefärbt und in einer Lösung aus Wasser, Methanol und Eisessig entfärbt.

Gelansatz zur Elektrophorese: siehe Polyacrylamidgelelektrophorese (Abschn. 2.4.2.).

Gelpuffer, Elektrophoresepuffer: Natriumphosphatpuffer 0,025 M, pH 7,1 mit 0,1 % SDS.

2.4.4. Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Harnstoff-Gelelektrophoresen wurden nach dem Verfahren von POOLE et al. (1974) in Gelröhrchen (0,5 x 10 cm, Gellänge 8 cm) mit Gelkonzentrationen von 7,5 % und 10 % durchgeführt; das Verhältnis Acrylamid zu N.N'-methylenbisacrylamid war 150:1. Durch Vorelektrophorese von ca. 2 Stunden mit Methylengrün als Marker und einer Stromstärke von 2 mA/Röhrchen wurden alle geladenen Teilchen, außer Protonen und Azetat-Anionen, aus den Gelen entfernt. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei Zimmertemperatur und einer Stromstärke von 1,5 mA/Röhrchen.

Die lyophilisierten Biliproteidproben wurden entweder ohne Vorbehandlung in 8 M Harnstoff, 35 % Essigsäure gelöst (1 mg Protein/ml) und der Elektrophorese unterworfen oder vorher reduziert und carboxymethyliert. Hierzu wurden die Biliproteide in 0,9 ml eines Inkubationspuffers gelöst, der 9 M Harnstoff, 0,11 M Tris-HCl pH 8,5 und 0,11 M 2-Mercaptoäthanol enthielt. Die Reduktion erfolgte über Nacht bei Zimmertemperatur. Durch Zugabe von je 30 mg Jodazetamid wurden die Proteinproben carboxymethyliert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 0,1 ml Eisessig unterbrochen. Biliproteidproben von 5 - 20 µg Protein wurden zur Elektrophorese auf die gespülten Oberflächen der Gele aufgetragen und nach dem Lauf mit Coomassie-Brilliant-Blau G 250 gefärbt und durch Diffussion entfärbt.

Gelansatz zur Harnstoff-Elektrophorese

Stammlösungen:

A.	40	%	Acrylamid
	0,268	%	Bisacrylamid
	17	%	Harnstoff
			in Wasser
B.	43,2	%	Eisessig
	50	%	Harnstoff
	4	%	TEMED
			in Wasser
C.	0,1	%	Ammoniumpersulfat
			in 10 M Harnstoff
D.	17	%	Harnstoff
			in Wasser

Ansatz für 9 Gelröhrchen:

10 % Gel:	7,5 % Gel:
4 ml A	3 ml A
2 ml B	1 ml D
10 ml C	2 ml B
	10 ml C

Elektrophoresepuffer: 0,9 M Essigsäure mit 1 % 2-Mercaptoäthanol
Elektrodenpolarität: Anode oben

2.4.5. Densitometrie der Elektropherogramme

Densitometrische Analysen der Elektropherogramme wurden in einem PMQ II Spektralphotometer durchgeführt, das mit einem selbstgebauten Gelschlitten ausgerüstet war. Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gele wurden bei 605 nm vermessen und ihre Transmission mit Hilfe eines Kompensationsschreibers (SERVOGOR, Typ R 446) registriert. Die Mengenverhältnisse der einzelnen Biliproteide und ihrer Untereinheiten wurden durch Auswiegen der Papierflächen unter den Absorptionsmaxima und Normierung auf einheitliche Molekulargewichte bestimmt.

2.5. Chromatographische Methoden

2.5.1. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie

Die Molekulargewichte der Biliproteide wurden durch Gelfiltration nach ANDREWS (1964) an SEPHADEX G 100 bei 4 °C in 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 bestimmt (Säule: 90 x 1 cm, Gelbettvolumen 70 cm^3, Durchfluß 12,8 ml/Std.). Die Eichproteine Aldolase (147 000 Dalton), Rinderserumalbumin (67 000 Dalton), Hühnereieralbumin (45 000 Dalton), Chymotrypsinogen A (25 000 Dalton) und Cytochrom c (13 500 Dalton) wurden von BOEHRINGER (Mannheim) erworben. Die Bestimmung des Ausschlußvolumens (V_o) der Trennsäule erfolgte mit Dextran Blau 2000 (2 x 10^6 Dalton, PHARMACIA, Schweden). Alle Eichproteine und Dextran Blau wurden in 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Konzentration der eingesetzten Biliproteidproben wurde nach LOWRY et al. (1951) ermittelt und variierte je nach Experiment im Bereich von 0,25 mg/ml bis 10 mg/ml; gewöhnlich wurden 1 ml einer Lösung von 0,5 mg/ml Protein eingesetzt.

Die Messung und Registrierung der Absorption des Säuleneluates erfolgten mit Hilfe eines Durchflußphotometers (Uvicord II, LKB, Schweden) bei 280 nm in Verbindung mit einem Fallbügelschreiber. Zur Auswertung der Molekulargewichtsbestimmung wurden die Elutionsdiagramme herangezogen, aus denen die Elutionsvolumina (V_e) der einzelnen Eichproteine und der Biliproteine abgelesen werden konnten. Nach der Gleichung $V_e/V_o = K \times \log MG$ (MG = Molekulargewicht) wurde eine Eichgerade erstellt, aus der dann die unbekannten Molekulargewichte der Biliproteide ermittelt werden konnten.

2.5.2. Präparative Trennung der Biliproteiduntereinheiten durch Ionenaustauscherchromatographie

Die α- und β-Untereinheiten der gereinigten Biliproteide wurden durch Ionenaustauscherchromatographie an Bio-Rex 70 (Minus 400 Mesh), einem schwach sauren Kationenaustauscher, aufgetrennt (GLAZER und FANG, 1973). Die Trennsäule, 2,5 x 15 cm, Durchfluß 50 ml/Std., war mit 0,4 % (Vol./Vol.) Essigsäure pH 3,0, äquilibriert. Zur Chromatographie wurden lyophilisierte Biliproteidproben in 0,05 M Natriumazetatpuffer pH 5,5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol gelöst und durch Zugabe von Eisessig auf pH 3,0 gebracht. Neben gefriergetrockneten Proben wurden auch Biliproteide zur Kontrolle benutzt, die aus 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 in 0,05 M Natriumazetat pH 5,5 umgepuffert wurden. Proben von 5 - 8 ml (ca. 0,5 mg Protein/ml) wurden auf die Trennsäule aufgetragen und absorbierten in einer schmalen Zone. Nach Waschen der Säule mit 0,4 % Essigsäure, erfolgte die Auftrennung der Untereinheiten in ansteigenden diskontinuierlichen Harnstoffgradienten in 0,4 % Essigsäure pH 3,0. Die Volumina der einzelnen Gradientenstufen und ihre Harnstoffkonzentrationen wurden den jeweiligen Trennproblemen angepaßt.

Aufbau der diskontinuierlichen Harnstoffgradienten:

1. Trennung der Untereinheiten von Phycoerythrin-545

0,4 % Essigsäure: 20 ml, 4,0 M Harnstoff: 30 ml, 6,0 M Harnstoff: 30 ml, 8,0 M Harnstoff: 40 ml, 8,5 M Harnstoff: 50 ml, 9,0 M Harnstoff: 25 ml, 10 M Harnstoff: 150 ml.

2. Trennung der Untereinheiten von Phycoerythrin-555

0,4 % Essigsäure: 20 ml, 4,0 M Harnstoff: 30 ml, 6,0 M Harnstoff: 30 ml, 7,0 M Harnstoff: 20 ml, 8,0 M Harnstoff: 80 ml, 8,5 M Harnstoff: 10 ml, 9,0 M Harnstoff: 135 ml.

3. Trennung der Untereinheiten von Phycocyanin-645

0,4 % Essigsäure: 20 ml, 4,0 M Harnstoff: 40 ml, 6,0 M Harnstoff: 20 ml, 6,5 M Harnstoff: 115 ml, 7,0 M Harnstoff: 15 ml, 8,0 M Harnstoff: 15 ml, 8,5 M Harnstoff: 100 ml, 9,0 M Harnstoff: 60 ml, 10 M Harnstoff: 80 ml.

2.6. Isolation und Reinigung von Phycobilisomen, Phycobilisomendissoziaten, B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin aus Rhodella violacea

2.6.1. Isolation und Präparation von Phycobilisomen

Die Isolierung von Phycobilisomen erfolgte nach den von KOLLER et al..(1977) beschriebenen Methoden aus 1000 Lux Kulturen der Rotalge Rhodella violacea. Hierzu wurden die Zellen aus dem Nährmedium abzentrifugiert, gewaschen und in 0,65 M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert. Die Algenzellen wurden durch Ultraschallbehandlung bei 12 °C (5 x 30 Sek.) aufgeschlossen und das Homogenat für 15 Min. in 1 % Triton X 100 inkubiert. Zellfragmente und Stärke wurden durch Zentrifugation (42 000 x g/15 Min.) entfernt. Je 1,5 bis 2,0 ml des Überstandes wurden zur weiteren Reinigung auf kontinuierliche Dichtegradienten gelagert (0,2 bis 0,75 M Saccharose in 0,65 M Phosphatpuffer) und mit 120 000 x g für 14 - 15 Std. bei einer Temperatur von 12 °C zentrifugiert (SW 27 Rotor, Spinco L2 65 B, BECKMAN Instr.). Die Phycobilisomenfraktionen wurde aus den Dichtegradienten eluiert und sofort mit Glutaraldehyd (25 % SERVA, Heidelberg) fixiert. Die Endkonzentration an Glutaraldehyd variierte zwischen 0,1 % und 4 %, die Fixa-

tionsdauer zwischen 10 und 60 Min. Nach der Fixierung wurden die Phycobilisomenpräparationen gegen dest. Wasser unter ständigem Rühren dialysiert, um Präzipitation zu vermeiden. Die Proteinkonzentrationen wurden spektroskopisch aus dissozierten Proben bestimmt (KOLLER et al., 1977); sie lagen im Bereich von 0,2 bis 0,5 mg/ml.

Die Wirksamkeit der Fixierung wurde durch Dichtegradientenzentrifugation von fixiertem Phycobilisomenmaterial überprüft und in Parallelversuchen das Verhalten von fixierten und unfixierten Phycobilisomenpräparationen verglichen. In weiteren Zentrifugationsexperimenten wurde bei sonst unveränderten Zentrifugationsbedingungen die Phosphatpufferkonzentration von 0,65 M auf 0,03 M gesenkt.

2.6.2. Isolation und Präparation von Phycobilisomendissoziaten

Gewinnung von Phycobilisomendissoziaten: Frische Phycobilisomenpräparationen wurden gegen 0,65 M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert, um Saccharose zu entfernen, und anschließend mit dest. Wasser 10 fach, bis zu einer Pufferkonzentration von 0,065 M, verdünnt. Zur Vervollständigung der Dissoziation wurde 10 - 15 Min. stehen gelassen und mit 0,1 % Glutaraldehyd fixiert.

Auftrennung von Phycobilisomendissoziaten: Phycobilisomensuspensionen wurden durch Ultrafiltration (AMICON-Filter PM 30) angereichert und an SEPHADEX G 25 dissoziiert. Das Biliproteideluat wurde konduktometrisch mit Phosphatpuffer pH 7,0 auf eine Ionenstärke von 1 mM gebracht und 12 Std. bei 4 °C stehen lassen. Die wiederum durch Ultrafiltration angereicherten Phycobilisomendissoziate wurden durch Ultrazentrifugation bei 113 000 x g (14 Std., 14 °C, Rotor SW 27, BECKMAN Instr.) in einem kontinuierlichen Dichtegradienten von 0,15 M - 0,35 M Saccharose in 0,65 M Phosphat-Puffer pH 7,0 aufgetrennt (KOLLER et al., 1978). Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Biliproteidbanden eluiert und nach Glutaraldehydfixierung dialysiert.

2.6.3. Isolation und Präparation von B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin

Dissoziierte und angereicherte Phycobilisomensuspensionen wurden in kontinuierlichen Dichtegradienten von 0,20 - 0,55 M Saccharose in 0,003 M Sörensen-Puffer pH 7,0 nach KOLLER (1978) aufgetrennt (15 Std., 113 000 x g, Rotor SW 27, BECKMAN Instr.). Die vorwiegend B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin/Allophycocyanin enthaltenden Zonen wurden eluiert und in AMICON-Ultrafiltrationszellen (Filtertyp PM 30) angereichert.

Die Reinigung der Phycoerythrinfraktion erfolgte in einer präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese (KOLLER und WEHRMEYER, 1975); die B-Phycoerythrin I Bande wurde aus dem Gel eluiert und wiederum angereichert. Die C-Phycocyanin-Allophycocyaninfraktion wurde gegen 0,03 M Sörensen-Puffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl dialysiert und durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-SEPHADEX A 50 in einem ansteigenden Gradienten von 0,15 - 0,40 M NaCl in 0,03 M Sörensen-Puffer aufgetrennt. B-Phycoerythrin I, C-Phycocyanin und Allophycocyanin wurden nach elektrophoretischer Reinheitskontrolle zur Elektronenmikroskopie präpariert.

2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Präparation der Ultradünnschnitte: Zur elektronenmikroskopischen Präparation wurden die aus dem Nährmedium abzentrifugierten und gewaschenen Algen mit 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen-Puffer fixiert; die Nachfixierung erfolgte nach vier Waschungen im gleichen Puffer mit 1 % OsO_4 in 0,1 M Sörensen-Puffer. Nach Alkoholentwässerung und Imprägnierung erfolgte die Einbettung in Epon 812 nach LUFT (1961). Die Ultradünnschnitte wurden an einem Ultramikrotom ULTROTOME III (LKB, Schweden) hergestellt und mit Uranylazetat und Bleizitrat nach STEMPAK und WARD (1964) doppelt kontrastiert.

Negativkontrastpräparationen: Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Phycobilisomen, Phycobilisomen-

dissoziate und gereinigten Biliproteide erfolgten im Negativkontrast. Die Präparationen wurden nach der "Drei-Tropfen-Technik" (NERMUT, 1973) oder nach dem von VALENTINE et al. (1968) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Drei-Tropfen-Technik:
Als Objektträger dienten 400 Mesh Kupfernetzchen, die mit PIOLOFORM befilmt und zur Stabilisierung mit einer 3 - 5 nm dicken Kohleschicht bedampft waren. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Netzchen zur Hydrophilisierung 5 Sek. einer Glimmentladung in 0,1 Bar Luft ausgesetzt (Präparationsanlage BALZERS 301, Liechtenstein). Zur Herstellung der Negativkontrastpräparate wurden die Objektträger auf Tropfen der Präparatesuspension flottiert; nach einer Adsorptionszeit von 15 - 120 Sek. wurde in Wasser gewaschen und anschließend 15 - 60 Sek. durch Flottieren auf Negativkontrastmittel kontrastiert. Überschüssige Kontrastlösung wurde mit Filtrierpapier vorsichtig abgesaugt.

Für Routineuntersuchungen wurden gleiche Volumina von Präparatesuspension und Negativkontrastmittel gemischt und auf die Objektträger pipettiert; nach 30 - 120 Sek. wurde die überschüssige Suspension abgesaugt.

Methode nach Valentine:
Dünne Kohlefolien (ca. 3 - 6 nm) wurden zur Adsorption der Biliproteide 15 - 60 Sek. von Glimmerplättchen auf Präparatesuspensionen abflottiert, wieder auf Glimmer aufgenommen, mit dest. Wasser gewaschen und schließlich auf Negativkontrastmittel abflottiert. Nach 30 - 60 Sek. wurden die Kohlefolien mit 400 Mesh Netzchen aufgenommen und auf Filtrierpapier getrocknet. Als Negativkontrastmittel dienten wässrige filtrierte Lösungen von 1 und 2 % (Gew./Vol.) Natrium-Phosphowolframat pH 6,8 und Uranylazetat pH 4,5 - 5,5.

Die Untersuchung der Präparate erfolgte unmittelbar nach Herstellung in einem PHILIPS 301 G Elektronenmikroskop, das mit einer Objektraumkühlung ausgestattet war. Photographiert wurde bei geeichten Vergrößerungsstufen von 22 000, 28 000, 36 000, 43 000, 59 000 und 75 000 x; die Vergrößerungsstufen wurden mit Ferritin als Testpräparat kontrolliert.

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Feinstrukturelle und biochemische Untersuchung der Biliproteide von Chroomonas, Cryptomonas und Hemiselmis (Cryptophyceae)

3.1.1. Feinstruktur der Biliproteide von Chroomonas, Cryptomonas und Hemiselmis

Während erste feinstrukturelle Untersuchungen an Rotalgenplastiden kurz nach Einführung der Glutaraldehydfixierung bereits 1965 zu der bemerkenswerten Entdeckung von Biliproteidaggregaten an den Thylakoidoberflächen führten (GANTT und CONTI, 1965, 1966, 1967), wurden entsprechende Feinstrukturuntersuchungen an Cryptophyceen erheblich später durchgeführt (DODGE, 1969, WEHRMEYER, 1970, GANTT et al., 1971). Sie führten zu dem übereinstimmenden Befund einer völlig abweichend organisierten Plastide: 1. besitzen die Plastiden überwiegend eng parallel verlaufende, meist zu zweit gepaarte Thylakoide, die eine Anordnung von Biliproteidaggregaten in morphologisch distinkten Partikeln an den Oberflächen nicht zulassen, 2. sind die Innenräume der Thylakoide von einem stark elektronenstreuenden Material dicht erfüllt, dessen Biliproteidnatur wahrscheinlich gemacht werden konnte (GANTT et al., 1971). Der qualitative Aspekt der Organisation der Cryptophyceenplastide ist in Tafel I (S.105) am Beispiel von Hemiselmis rufescens dargestellt; es dominiert eine mehr oder weniger disperse intrathylakoidale Biliproteidverteilung. Aufnahmen hoher Primärvergrößerung lassen jedoch lokal eine Musterbildung erkennen, die ein Hinweis auf aggregierte Biliproteide sein könnte. Diese Muster sind in Tafel II (S.107) in Form feiner Säulchenreihen senkrecht zur Thylakoidmembran sichtbar. Die Säulchen stehen entweder nur mit einer oder mit beiden Thylakoidmembranen in Kontakt. Da die Bindungskräfte

zwischen den Biliproteidaggregaten untereinander und den Biliproteiden und den Thylakoiden sehr schwach sein müssen (s.u.), sind die angesprochenen Strukturen sehr labil und nicht immer gut erkennbar. Immerhin wurden zur Prüfung dieser Vorstellung Versuche zur Isolation von materialerfüllten Thylakoiden unternommen. Bei der Isolation der Thylakoide von Cryptophyceen wurden möglichst stabilisierende Bedingungen gewählt, die bei Rotalgen und Cyanobakterien zu einer weitgehenden Strukturerhaltung von Biliproteidaggregaten führen. So wurde in höhermolarem Phosphatpuffer (0,5 M) unter Zusatz stabilisierender Reagenzien wie 20 % (Gew./Vol.) Saccharose bzw. Ficoll (SUSOR und KROGMAN, 1964) oder 30 % (Gew./Vol.) Carbowax 4000 (FREDRICKS und JAGENDORF, 1964) gearbeitet. Dennoch traten die Biliproteide in den Überstand, so daß die beabsichtigte elektronenmikroskopische Analyse entfallen mußte. Die Untersuchungen konnten also nicht endgültig klären, ob die Biliproteide intrathylakoidal dispers verteilt vorliegen oder ob sie labile, aber geordnete Verbände bilden.

Bereits unmittelbar nach der Entdeckung der Biliproteide in Cryptophyceen hatten HAXO und FORK (1959) aufgrund der zur vollständigen Biliproteidfällung notwendigen, sehr hohen Ammoniumsulfatkonzentration von 80 - 85 % ein im Vergleich zu den Rotalgen geringeres Molekulargewicht für die Biliproteide aus Cryptophyceen postuliert. Angesichts dieser Tatsache wurden zur weiteren Charakterisierung der Biliproteide in Cryptophyceen und insbesondere ihres Aggregationsverhaltens hauptsächlich biochemische Methoden eingesetzt.

3.1.2. Biochemische Untersuchung zum Aggregationszustand der Biliproteide von Cryptophyceen.

3.1.2.1. Isolation der Cryptophyceen-Biliproteide.

Voraussetzung für die nähere biochemische Charakterisierung der Cryptophyceen-Biliproteide war ihre Isolierung und Reindarstellung. Sie erfolgte, wie im Abschnitt über Material

und Methoden bereits angegeben, nach Zellaufbruch durch eine Kombination von fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und isoelektrischer Fokussierung. Gefunden wurde in allen untersuchten Arten nur jeweils ein Biliproteid, und zwar in Hemiselmis rufescens Phycoerythrin-555 in Cryptomonas maculata Phycoerythrin-545 und in Chroomonas spec. Phycocyanin-645.

Das Ergebnis jedes einzelnen präparativen Schrittes während der Biliproteidisolation wurde spektralphotometrisch kontrolliert. Dadurch konnte festgestellt werden, daß die 40 000 x g-Zentrifugation im Anschluß an den Zellaufschluß durch Ultraschall nicht ausreichte, um thylakoidgebundenes Chlorophyll und Carotinoide quantitativ abzutrennen. Dies gelang fast vollständig durch die eingeschaltete Ammoniumsulfatfällung mit einem Sättigungsgrad von 45 %. Als ein weiteres Kriterium der Reinheit wurde der Absorptionsquotient $A_{\lambda max}/A_{280}$ bestimmt. Dieser für Phycocyanin-645 durch A_{645}/A_{280} gegebene Quotient stieg im Laufe der Reinigung von 0,47 (Überstand nach Zellaufschluß und Zentrifugation) über 0,72 nach der Ammoniumsulfatfällung auf 6,2 (Reinigung an SEPHADEX G 100) und 6,8 (Reinigung an Celite). Für gereinigtes Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas und Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis ergaben sich Absorptionsquotienten von 7,0 und 11,0. Verglichen mit Literaturdaten sind die hier ermittelten Absorptionsquotienten als hoch anzusehen (BROOKS und GANTT, 1973, MAC COLL et al., 1973); dies deutet auf eine gute Reinigung der Pigmente hin.

Nicht uneingeschränkt werden Absorptionsquotienten als Reinheitskriterien anerkannt, da bei Cyanobacterien- und Rhodophyceen-Biliproteiden aggregationsabhängig Blauverschiebungen des Hauptmaximums und Änderungen des molaren Extinktionskoeffizienten vorkommen können (LEE und BERNS, 1968, GLAZER et al., 1973). Da bei den Biliproteiden von Cryptophyceen derartige spektrale Veränderungen mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden können, wie weiter unten näher ausgeführt wird, gelten die aufgeführten Einschränkungen bei Cryptophyceen nicht.

3.1.2.2. Trennung der multiplen Biliproteidformen

Elektrophoretische Kontrollen während der Reinigung zeigten, daß keines der untersuchten Biliproteide einheitlich war, sondern in mehrere Pigmentformen aufspaltete. So wiesen Phycocyanin-645 aus Chroomonas spec. fünf, Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis rufescens sechs und Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas maculata schließlich drei Biliproteidbanden in der isoelektrischen Fokussierung auf. Als Erklärung für dieses auch bei Biliproteiden aus anderen Arten gefundene Verhalten wurden unterschiedliche Aggregationszustände und/oder eine variable Untereinheitenkomposition im Sinne von $\alpha\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha\beta_2$ bzw. $\alpha_2\beta_2$ usw. angenommen (GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1975). Angesichts der hier vorliegenden Fragestellung mußten diese Vermutungen überprüft werden. Dazu war es erforderlich, im Rahmen einer präparativen Isoelektrofokussierung soviel reines Biliproteid zu gewinnen, daß eine nähere biochemische Charakterisierung der in den Banden vorliegenden Biliproteidformen durchführbar wurde. Das in nur drei Banden aufspaltende Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas maculata schien von der Bandenzahl und deren relativen Mengenverhältnissen zueinander her gesehen am besten geeignet und wurde daher exemplarisch untersucht. Die präparative Auftrennung von Phycoerythrin-545 gelang durch eine zweistufige Isoelektrofokussierung, wobei in dem ersten Trennschritt in dem Bereich pH 3,5 - 10,0 die basische Phycoerythrinform (IEP 7,83) von den beiden sauren (IEP 5,05, 4,84) abgetrennt wurde. In den folgenden Fokussierungen mit schmalen Bereichen von pH 7,4 - 8,4 und pH 4,5 - 5,5 erfolgte dann die eigentliche Reinigung der Biliproteidformen.

Die Absorptionsquotienten der gereinigten und von Ampholyten befreiten Phycoerythrine lagen bei 8,8 für die IEP 7,83 -, bei 6,9 für die IEP 5,05 - und bei 8,3 für die IEP 4,84 - Phycoerythrinform. Eine Refokussierung der isolierten Banden in der analytischen Gelelektrofokussierung (Abb. 9) führte zu einer identischen Bandenfolge und spricht für die Reinheit der Fraktionen.

Auf die oben gestellte Frage **nach** dem Aggregationszustand der hier betrachteten Cryptophyceen-Biliproteide wird weiter unten im Abschnitt 3.1.2.6. über die Untereinheitenzusammensetzung der Phycoerythrinformen Bezug genommen. Erste Hinweise jedoch ergeben sich bereits aus den Absorptionsspektren.

3.1.2.3. Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren der gereinigten Biliproteide Phycoerythrin-545, Phycoerythrin-555 und Phycocyanin-645 sind im Vergleich zu den Absorptionsspektren der lebenden Zellen in den Abbildungen 1,2 und 3 dargestellt. Es ist dabei bemerkenswert, daß die Absorptionsmaxima der Biliproteide "in vitro" mit denen intakter Zellen nahezu überein-

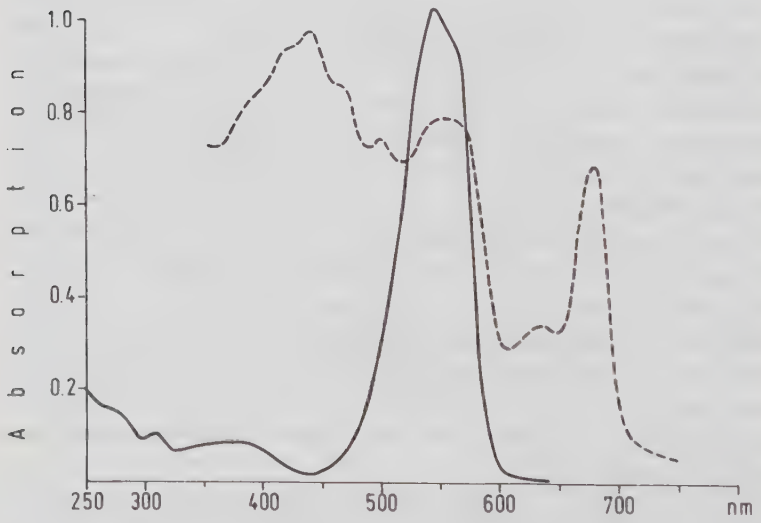


Abb. 1. "In vivo" Absorptionsspektrum von Cryptomonas maculata (- - -); Absorptionsspektrum von Phycoerythrin-545 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

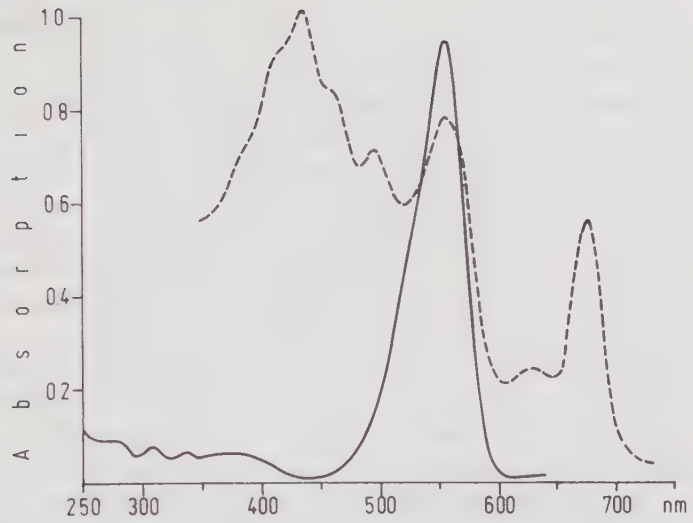


Abb. 2. "In vivo" Absorptionsspektrum von Hemiselmis rufescens (- - -); Absorptionsspektrum von Phycoerythrin-555 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

stimmen, was für einen nativen Zustand der isolierten Biliproteide spricht.

Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas maculata (Abb. 1) ist durch ein Hauptabsorptionsmaximum bei 544 nm charakterisiert, daß im langwelligen Bereich des Spektrums direkt in eine gut ausgeprägte Schulter übergeht. Nebenmaxima erscheinen im Spektrum bei 307 und 372 nm, eine breite Schulter bei 274 nm. Hemiselmis rufescens besitzt Phycoerythrin-555 (Abb. 2), dessen Hauptabsorptionsmaximum bei 555 nm liegt; sekundäre Maxima befinden sich bei 373, 334 und 307 nm, Schultern bei 530 bis 535 und 278 nm. Phycocyanin-645 aus Chroomonas spec. (Abb. 3) besitzt im sichtbaren Spektralbereich Maxima bei 645 und 584 nm und eine Schulter bei 620 nm, darüber hinaus kleinere Maxima bei 275 und 369 nm und eine schwache Schulter bei 340 nm.

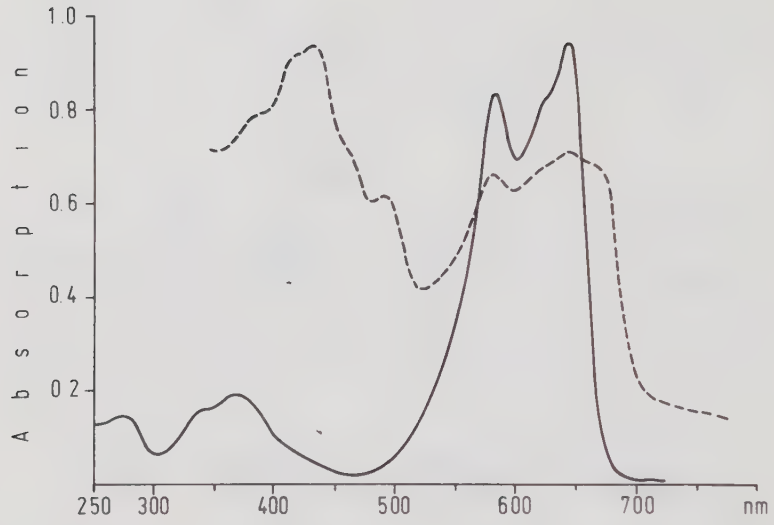


Abb. 3. "In vivo" Absorptionsspektrum von Chroomonas spec. (- - -); Absorptionsspektrum von Phycocyanin-645 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

Angesichts der Fragestellung sollten die Spektraleigenschaften der Biliproteide vor allem im Hinblick auf eine mögliche Variation des Aggregationszustandes geprüft werden.

Bei Biliproteiden aus Cyanobakterien und Rotalgen wechselt die Aggregationsstufe infolge von Dissoziations- und Assoziationsreaktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Ionenstärke des Puffermediums, der Biliproteidkonzentration und der Temperatur (HATTORI et al., 1965, NEUFELD und RIGGS, 1969, MAC COLL et al., 1971, VERNOTTE, 1971). Im charakteristischen Fall verschieben sich bei Dissoziation die Hauptabsorptionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen hin und die molaren Extinktionskoeffizienten sinken beträchtlich (GLAZER et al., 1973).

Eine zehnfache Verdünnung der Cryptophyceen-Biliproteide Phycocyanin-645 und Phycoerythrin-545 von ca. 1,3 auf 0,13 mg/ml zeigte hingegen keine sichtbare Verschiebung der Hauptabsorptionsmaxima nach kürzeren Wellenlängen und auch keine zusätzliche Absorptionsabnahme. Differenzspektren, die mit Phycoerythrin-545 und Phycocyanin-645 in Konzentrationen von 1,3 mg/ml gegen 0,65 mg/ml aufgenommen wurden, ließen ebenfalls keine konzentrationsabhängigen spektralen Änderungen erkennen. Differenzspektren von Biliproteiden gleicher Konzentration (0,4 mg/ml) in Natriumazetatpuffer (0,05 M), pH 5,5 und in Sörensen-Puffer (0,03 M), pH 7,0 ergaben keinen Hinweis auf eine pH-Wert-abhängige Aggregation verbunden mit spektralen Verschiebungen. Schließlich erwies sich auch die Herabsetzung der Ionenstärke des Sörensen-Puffers (pH 7,0) von I: 0,03 auf I: 0,003 als unwirksam auf die Absorption im sichtbaren Spektralbereich. Diese Versuche lassen es daher als sicher erscheinen, daß die Biliproteide der Cryptophyceen keine oder nur geringe Tendenzen zur Dissoziation und Assoziation haben und damit in einem höchst stabilen Aggregationszustand vorzuliegen scheinen. Über die vorherrschende Aggregationsstufe selbst lassen die spektrophotometrischen Untersuchungen zunächst keine Aussage zu.

Wie oben bereits ausgeführt, konnten von Phycoerythrin-545 aus Cryptomonas maculata drei konstituierende Pigmentformen in der isoelektrischen Fokussierung ermittelt werden. Die den IEP 7,83- , IEP 5,05- und IEP 4,84- Phycoerythrinen zukommenden Absorptionsspektren sind in Abb. 4 dargestellt. Alle drei Phycoerythrinformen besitzen ein Hauptabsorptionsmaximum bei 544 nm, das zum langwelligen Bereich des Spektrums hin direkt in eine gut ausgeprägte Schulter übergeht. Diese Schulter liegt bei den negativ geladenen Phycoerythrinformen (IEP 4,84, 5,05) bei 555 bzw. 557 nm, bei der positiv geladenen Form (IEP 7,83) bei 560 nm. Die Nebenmaxima im kurzwelligen Bereich sind bei allen Phycoerythrinformen gleich. Die nur geringfügigen Abweichungen untereinander bei gleichbleibendem Hauptabsorptions-

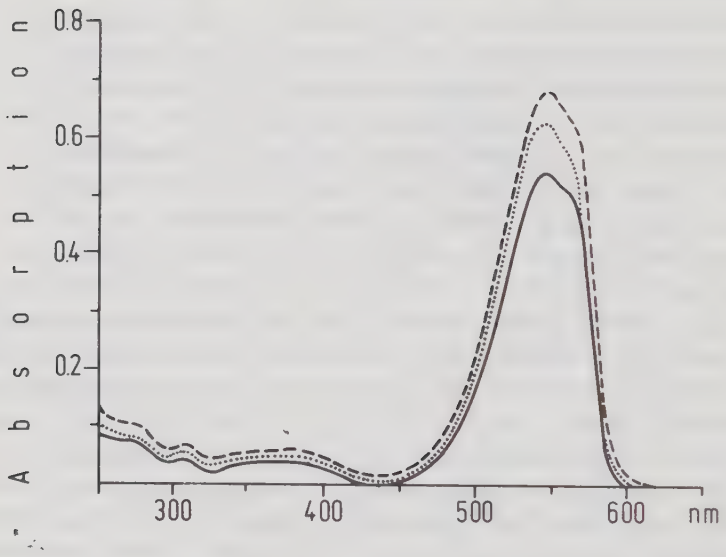


Abb. 4. Absorptionsspektren der multiplen Phycoerythrin-555-formen; Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0. Phycoerythrin IEP 7,83 (———), IEP 5,05 (- - -) und IEP 4,84 (·····).

maximum sprechen gegen die Vorstellung eines erheblich voneinander abweichenden Aggregationszustandes der multiplen Phycoerythrinformen. Insgesamt wird damit deutlich gemacht, daß die zur Reindarstellung von Cryptophyceen-Biliproteiden notwendigen präparativen Schritte an dem Aggregationszustand der nativen Biliproteide keine nennenswerten Änderungen ausüben.

3.1.2.4. Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenzemissionsspektren von Zellsuspensionen intakter Cryptophyceenzellen und der gereinigten Biliproteide sind in Abb. 5 - 8 dargestellt. Die "in vivo" Fluoreszenzemissionsmaxima der Biliproteide Phycocyanin-645, Phyco-

erythrin-555 und Phycoerythrin-545 lagen bei Anregung im Bereich der Biliproteidabsorption bei 662, 584 und 587 nm und stimmen mit den Fluoreszenzemissionsmaxima der isolierten Pigmente gut überein. Dies weist darauf hin, daß Aggregationsänderungen während des Zellaufschlusses und der Biliproteidisolation offensichtlich nicht eingetreten sind oder sich nicht in den Spektren manifestieren.

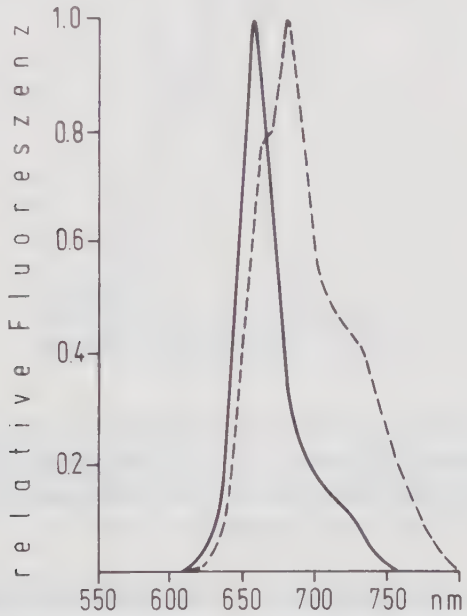


Abb. 5. "In vivo" Fluoreszenzemissionsspektrum von Chroomonas spec. (- - -), Anregung: 579 nm. Fluoreszenzemissionsspektrum von Phycocyanin-645 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum von Phycocyanin-645 (Abb. 5) zeigt ein scharfes Maximum bei 660 nm mit einer langwelligen Schulter bei 715 nm; das Fluoreszenzemissionsmaximum von Phycoerythrin-555 liegt bei 590 nm, eine Schulter bei 630 nm (Abb. 6). Die Fluoreszenzemissionsspektren

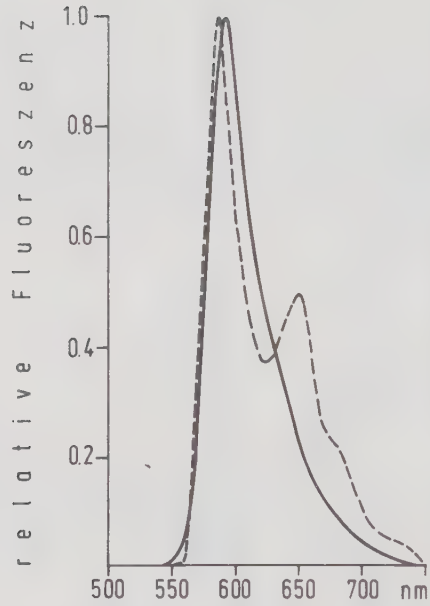


Abb. 6. "In vivo" Fluoreszenzemissionsspektrum von Hemiselmis rufescens (- - -), Anregung: 548 nm. Fluoreszenzemissionsspektrum von Phycoerythrin-555 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

der Phycoerythrin-545-Formen sind sich untereinander sehr ähnlich; sie unterscheiden sich nur durch geringfügige Verschiebungen der Fluoreszenzemissionsmaxima. So fluoreszieren die beiden Phycoerythrinformen mit den sauren IEP von 4,84 und 5,05 bei 586 nm, die basische Phycoerythrinform mit dem IEP von 7,83 dagegen bei 584 nm (Abb. 7,8). Allen Phycoerythrinformen gemeinsam ist eine Schulter bei 620 nm. Bei gleicher Absorption bezogen auf 544 nm ist die Fluoreszenz der Phycoerythrine mit den IEP von 4,84 und 5,05 um 6 bzw. 14 % geringer, als die der Phycoerythrinform mit dem basischen IEP von 7,83. Die ähnlichen Fluoreszenzemissionsmaxima der Phycoerythrin-545-Formen schließen unterschied-

Abb. 7. "In vivo" Fluoreszenzemissionsspektrum von Cryptomonas maculata (- - -), Anregung: 548 nm. Fluoreszenzemissionsspektrum von Phycoerythrin-545 (———), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

liche Aggregationsformen sehr wahrscheinlich aus; hingegen geben sie in Verbindung mit der unterschiedlichen Lage der Schultern in den Absorptionsspektren (Abschn. 3.1.2.3.) einen ersten Hinweis dafür, daß die langwellig absorbierende und fluoreszierende α-Phycoerythrinuntereinheit für das Auftreten der multiplen Pigmentformen verantwortlich gemacht werden könnte.

Da neben den Absorptionsspektren auch die Fluoreszenzspektren empfindliche Indikatoren von Aggregationsänderungen sein können, wurden die Biliproteide Phycocyanin-645 und Phycoerythrin-545 auch fluorometrisch bei unterschiedlichen Konzentrationen von 1,3 und 0,13 mg/ml in Sörensen-

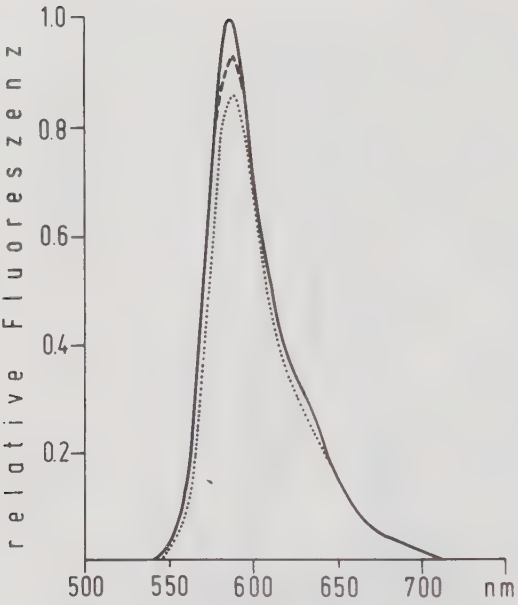


Abb. 8. Fluoreszenzemissionsspektren von Phycoerythrin-545 IEP 7,83 (——), IEP 5,05 (- - -) und IEP 4,84 (····), Lösungsmittel 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,0.

Puffer pH 7,0 untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten aggregations- und konzentrationsabhängigen spektralen Änderungen festgestellt werden. Auf eine Untersuchung bei unterschiedlichen pH-Werten wurde verzichtet, da unterschiedliche Puffermedien auch die Fluoreszenzspektren nachhaltig beeinflussen können.

Bei Anregung der Biliproteide mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge tritt keine spektrale Verschiebung der Fluoreszenzemissionsbanden auf, sondern es ändert sich nur die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtqualität. Die Fluoreszenzemissionsspektren der untersuchten Biliproteide sind sehr einheitlich gebaut; sie bestehen aus einer asymmetrischen Fluoreszenzemissionsbande mit einem scharfen Fluoreszenzemis-

sionsmaximum und einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Schulter, die im langwelligen Bereich des Spektrums flach ausläuft.

Bisher wurden in der Literatur fast ausschließlich symmetrische Fluoreszenzemissionsspektren beschrieben (O'H EOCHA et al., 1964, MAC COLL et al., 1973). Erst in jüngerer Zeit konnte das Vorkommen der asymmetrischen Fluoreszenzemissionsspektren von mehreren Autoren bestätigt werden (MÖRSCHEL und WEHRMEYER, 1975, 1977, MAC COLL et al., 1976). Dies steht in Einklang mit der Symmetrieregel von FÖRSTER (1951); danach kann bei Betrachtung des langwelligen Absorptionsgebiets eines Moleküls eine Bild- und Spiegelbildsymmetrie von Absorptions- und Fluoreszenzspektren postuliert werden. Die langwellig absorbierenden Phycobilinchromophore sind für die stark ausgeprägten Fluoreszenzemissionsmaxima verantwortlich, während die kurzwellig absorbierenden Chromophore die im langwelligen Bereich liegenden schwachen Schultern hervorrufen. Damit zeigen die Fluoreszenzspektren eindeutig, daß die kurzwellig absorbierenden Chromophore den überwiegenden Teil der aufgenommenen Lichtenergie intramolekular auf die langwellig absorbierenden Chromophore übertragen. In der treffenden Nomenklatur von TEALE und DALE (1970) würde man von sensibilisierenden (s) und fluoreszierenden (f) Chromophoren sprechen.

3.1.2.5. Elektrophoretisches Verhalten der Cryptophyceen-Biliproteide

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung zeigen die untersuchten Biliproteide Phycocyanin-645, Phycoerythrin-545 und Phycoerythrin-555 eine bemerkenswerte Ladungsheterogenität. Jedes Biliproteid besteht aus mehreren multiplen Pigmentformen, wie aus den Pherogrammen der isoelektrischen Fokussierungen in Abb. 9 und den Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in Abb. 10 zu erkennen ist.

Chroomonas Phycocyanin-645 besteht aus fünf multiplen For-

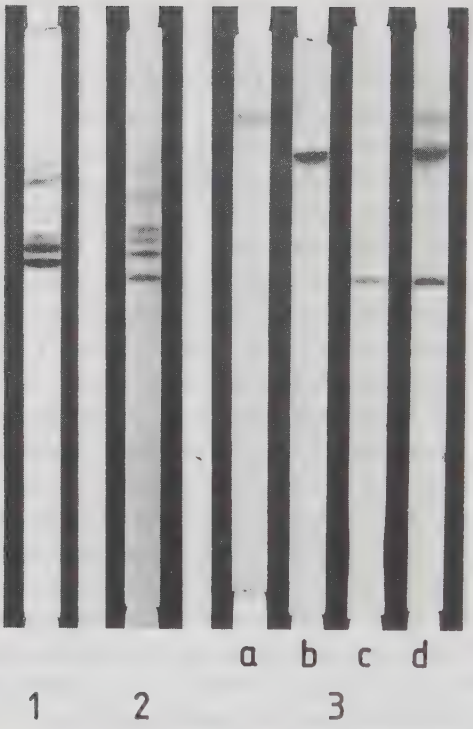
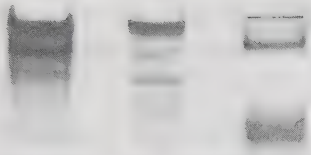


Abb. 9. Isoelektrische Fokussierung von 1. Phycocyanin-645, 2. Phycoerythrin-555, 3. Phycoerythrin-545: a) IEP 4,84, b) IEP 5,05, c) IEP 7,83, d) Rohextrakt. Bereich der Fokussierung: pH 3,5 - 10,0.

men, mit isoelektrischen Punkten von 7,03, 6,15, 5,75, 5,25 und 4,88; Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis spaltet in sechs multiple Pigmentformen auf, die bei pH 7,19, 6,30, 5,99, 5,73, 5,29 und 4,95 isoelektrisch sind. Die drei multiplen Phycoerythrin-545-Formen aus Cryptomonas haben isoelektrische Punkte bei pH 7,83, 5,05 und 4,84. Koelektrophoresen zeigen, daß - unter den gegebenen Elektrophoresebedingungen - die Banden mit den höchsten isoelektrischen Punkten den Banden mit der geringsten elektrophoretischen



1 2 3

Abb. 10. Elektropherogramme der vorgereinigten Biliproteidextrakte. 1. Phycocyanin-645, 2. Phycoerythrin-555, 3. Phycoerythrin-545. Elektrophoresepuffer: 0,03 M Tris-Borat, pH 8,2.

Mobilität entsprechen. Die Mengenverhältnisse der multiplen Biliproteidformen einer Species stehen zueinander in konstanten Proportionen; unter den angewandten Kulturbedingungen und Isolationsmethoden wurde keine Verschiebung der Proportionen festgestellt.

Wenn bei Rhodophyceen- und Cyanobakterien-Biliproteiden eine ausgeprägte Ladungsheterogenität in der isoelektrischen Fokussierung beobachtet wurde(HABIG und BERNS, 1973), dann repräsentieren die einzelnen Banden meist unterschiedliche Aggregationsformen ein-und desselben Biliproteids; isomere Biliproteide werden seltener beschrieben (KOLLER und WEHRMEYER, 1975). Die hier vorgestellten Biliproteide können keine Aggregationsformen sein, da mit Hilfe der Molekulargewichtsbestimmung (Abschn. 3.1.2.8.) keine Hetero-

genität beobachtet wurde, die eine derartige Folgerung zuließe. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die multiplen Biliproteidformen native Pigmente, also Isopigmente darstellen, oder aber Artefakte, die während der Aufarbeitung entstanden sind.

Da eine Denaturierung während des Zellaufschlusses und der anschließenden Reinigungsprozedur unbedingt ausgeschlossen werden sollte, wurden die Cryptophyceenzellen mit unterschiedlichen Methoden aufgeschlossen und die Pigmentextrakte entweder direkt nach Abzentrifugieren der Zellfragmente oder aber erst nach Reinigung der Elektrophorese und der Elektrofokussierung unterworfen. Nach Aufschluß der Zellen durch Ultraschallbehandlung, durch Mörsern mit Seesand und durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen, traten immer wieder, qualitativ und quantitativ, die gleichen Bandierungsmuster auf, wie sie in den Elektropherogrammen in Abb. 9 und 10 dargestellt sind.

Wurden die gereinigten multiplen Phycoerythrin-545-Formen refokussiert, dann kehrten sie immer wieder zu ihren ursprünglichen isoelektrischen Punkten in den pH-Gradienten zurück; eine Bildung von artifiziellen Banden konnte auch hier nicht beobachtet werden. Die Möglichkeit einer Photooxydation, wie sie von GLAZER et al. (1971) als Ursache vermehrter Bandenbildung postuliert wurde, konnte hier ausgeschlossen werden, da alle Versuche im dunklen Grünlicht durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Experimente lassen den Schluß zu, daß die multiplen ladungsisomeren Biliproteidformen sehr wahrscheinlich native Pigmente darstellen und somit funktionelle Bestandteile der Chloroplasten von Cryptophyceen sind.

3.1.2.6. Untereinheitenanalyse durch Harnstoffelektrophorese

Das Vorkommen von multiplen Biliproteidformen wurde in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung festgestellt, aber nicht näher analysiert. Da sich Ladungs- oder Massenunterschiede der Biliproteidformen qualitativ und quantitativ im Untereinheitenmuster mani-

festieren sollten, mußte eine Untereinheitenanalyse durchgeführt werden. Phycoerythrin-545 und seine isolierten multiplen Formen wurden in der Harnstoffelektrophorese untersucht, da in ihr die Proteinuntereinheiten sowohl nach Ladung und Masse (Größe) aufgetrennt werden.

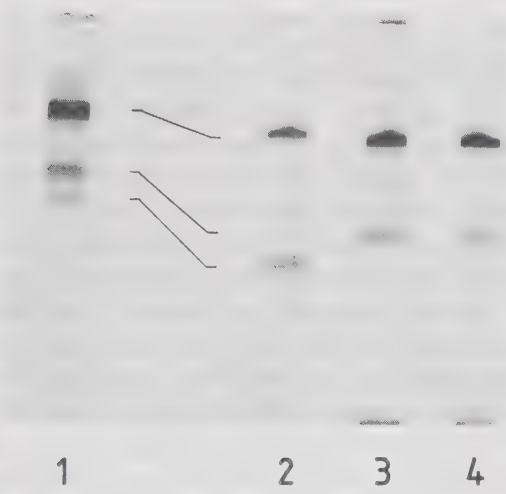


Abb. 11. Harnstoff-Gelelektrophorese der multiplen Phycoerythrin-545-Formen: 1. Phycoerythrin-545, 2. Phycoerythrin-545, IEP 7,83, 3. Phycoerythrin-545, IEP 5,05, 4. Phycoerythrin-545, IEP 4,84. Elektrophoresepuffer: 0,9 M Essigsäure, 1 % 2-Mercaptoäthanol.

Jede der reduzierten und alkylierten Phycoerythrin-545-Formen spaltet in zwei gut getrennte farbige Banden auf, wie in Abb. 11 zu erkennen ist. Die langsam wandernden Banden in den Pherogrammen stellen die β-Untereinheiten dar, die schnell wandernden die α-Untereinheiten. Während die β-Untereinheiten der multiplen Phycoerythrinformen in ihren elektrophoretischen Beweglichkeiten sehr ähnlich sind, zeigen die α-Untereinheiten bemerkenswerte Unterschiede. Die α-Ketten der basischen Phycoerythrin-545-Form (IEP: 7,83)

übertreffen in ihren Beweglichkeiten die der beiden sauren Phycoerythrinformen (IEP: 5,05 und 4,84). Somit kann das Vorkommen der multiplen Phycoerythrin-545-Formen auf eine Ladungsheterogenität der leichten α-Untereinheiten zurückgeführt werden. Bei Phycocyanin-645 treten neben Ladungsunterschieden auch Unterschiede im Molekulargewicht der α-Ketten auf, wie die SDS-Elektrophorese zeigt (Abschn. 3.1.2.9.).

Die biologische Bedeutung dieser Ladungsheterogenität ist bisher noch nicht geklärt. So wie Isoenzyme in der Regulation von metabolischen Prozessen eingesetzt werden (SCANDIALIOS, 1974), so könnten die multiplen Biliproteidformen, unter der Annahme nativen Vorkommens in den Chloroplasten der Cryptophyceen strukturell und funktionell unterschiedliche Aufgaben im Energietransport wahrnehmen. Bei den Cryptophyceen muß ein einziges Biliproteid die Funktionen durchführen, die bei Rhodophyceen und Cyanobakterien mehrere Biliproteide leisten. Die Aufgabe eines gerichteten Energietransfers innerhalb der Biliproteidmoleküle und die der Weiterleitung auf Chlorophyll durch Kopplung der Biliproteide an die Thylakoidmembran dürften eine Differenzierung voraussetzen, die durch die Ladungsheterogenität der Biliproteide gewährleistet werden könnte. Auf Ordnungsmuster innerhalb der intrathylakoidalen Räume der Cryptophyceen ist im Abschnitt 3.1.1. über die Feinstruktur bereits hingewiesen worden.

3.1.2.7. Untereinheitenanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie

Die in der Harnstoff-Elektrophorese (Abschn. 3.1.2.6.) und in der SDS-Elektrophorese (Abschn. 3.1.2.9.) analytisch getrennten Biliproteid-Untereinheiten wurden durch Ionenaustauscherchromatographie an dem Kationenaustauscher BIO-REX 70 bei pH 3,0 in ansteigenden Harnstoffgradienten präparativ isoliert. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Elution und die spektralen Eigenschaften der α- und β-Untereinheiten.

Tabelle 2: Eigenschaften der Biliproteiduntereinheiten

Biliproteid		Elution	Absorpt. Max.			Farbe
PE - 545	α	8,5 M Harnstoff	333		(590)565	violett
	β	10,0 M Harnstoff	308		555	rot
PE - 555	α	7,0 M Harnstoff	268	307	553	rot
	β	8,5 M Harnstoff	309	331	556	rot
PC - 645	α	8,5 M Harnstoff	368		697	grün
	β	9,0 M Harnstoff	334	605	663	blau

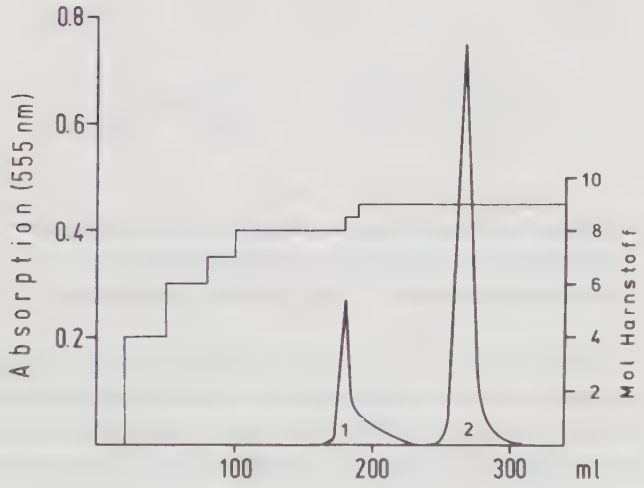


Abb. 12. Trennung der α- und β-Untereinheiten von Phycoerythrin-555 aus Hemiselmis rufescens an BIO-REX 70 bei pH 3,0 in Harnstoff. 1. α-Untereinheit, 2. β-Untereinheit.

Tabelle 2 und das Elutionsprofil von Phycoerythrin-555 in Abb. 12 zeigen, daß die leichten α-Untereinheiten bei niedrigeren (7,0 - 8,5 M/l) und die schweren β-Untereinheiten bei höheren (8,5 - 10,0 M/l) Harnstoffkonzentrationen von

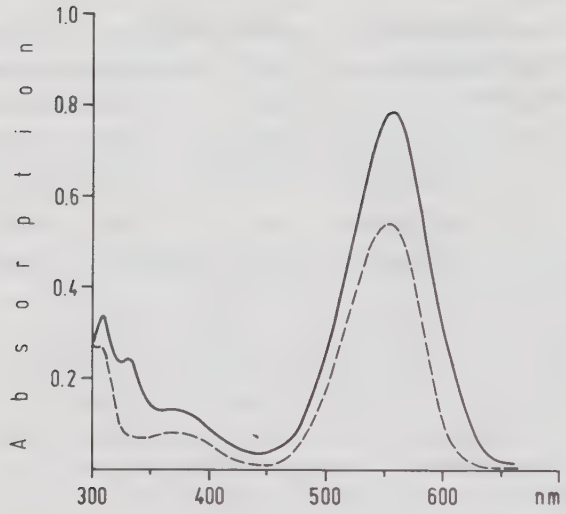


Abb. 13. Absorptionsspektren der α- (- - -) und ß- (——) Untereinheiten von Phycoerythrin-555 in 8,5 M Harnstoff, 0,4 % Essigsäure, 10 mM 2-Mercaptoäthanol.

den Säulen eluiert werden. Die ß-Untereinheiten absorbieren viel stärker als die α-Untereinheiten, so daß entweder eine größere Chromophorenzahl, höhere Extinktionskoeffizienten der Chromophore oder aber eine schwächere Wirkung des denaturierenden Harnstoffs auf die ß-Untereinheiten angenommen werden kann. Im Elutionsdiagramm von Phycoerythrin-555 (Abb. 12), das einen direkten spektralen Vergleich gestattet, ist die Absorption der ß-Untereinheit ca. dreimal so hoch, wie die der α-Untereinheit.

Die α- und ß-Ketten von Phycoerythrin-555 (Abb. 13) haben ähnliche spektrale Eigenschaften; im sichtbaren Bereich des Spektrums besitzen sie symmetrische Absorptionsbanden mit Maxima bei 553 nm und 556 nm. Die Untereinheiten von Phycoerythrin-545 (Abb. 14) unterscheiden sich dagegen in ihren spek-

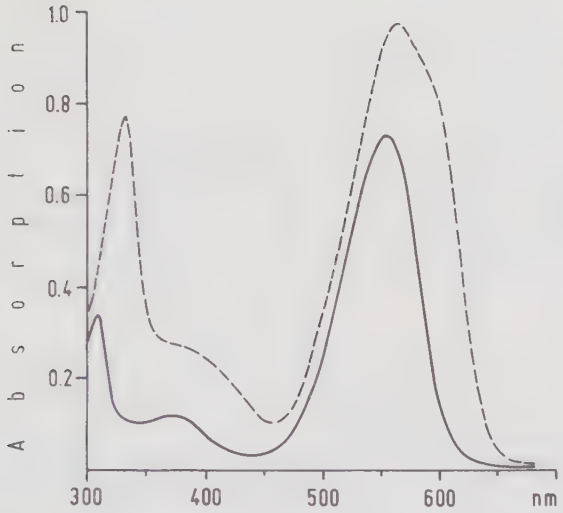


Abb. 14. Absorptionsspektren der α- (- - -) und ß- (———) Untereinheiten von Phycoerythrin-545 in 8,5 M Harnstoff, 0,4 % Essigsäure, 10 mM 2-Mercaptoäthanol.

tralen Eigenschaften sehr stark voneinander. Während die rote ß-Untereinheit ein symmetrisches Absorptionsmaximum bei 555 nm hat, absorbiert die violette α-Untereinheit bei 565 nm mit einer ausgeprägten Schulter bei 590 nm. Die blauen ß-Untereinheiten von Phycocyanin-645 (Abb. 15) besitzen ein doppelgipfliges Absorptionsspektrum mit Maxima bei 605 und 663 nm; die grünen α-Untereinheiten absorbieren maximal bei 697 nm.

Die Absorptionsspektren der α- und ß-Untereinheiten erlauben - in Verbindung mit den Absorptionsspektren der nativen Biliproteide - eine Identifizierung der Phycobilin-Chromophore. So besitzt Phycoerythrin-555 nur Phycoerythrobilin als Chromophor in beiden Untereinheiten, wie aus den Absorptionsspektren in Abb. 13 zu ersehen ist. Die ß-Unter-

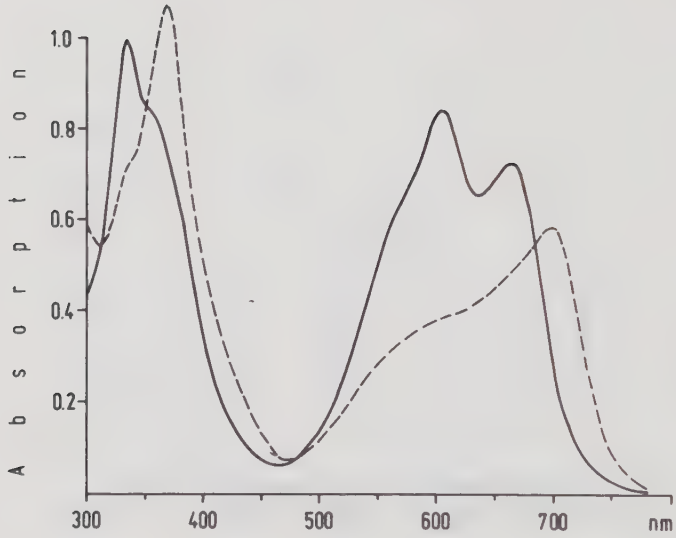


Abb. 15. Absorptionsspektren der α- (- - -) und β- (———) Untereinheiten von Phycocyanin-645 in 8,5 M Harnstoff, 0,4 % Essigsäure, 10 mM 2-Mercaptoäthanol.

einheiten von Phycoerythrin-545 sind den α- und β-Untereinheiten von Phycoerythrin-555 in ihrem spektralen Verhalten ähnlich; auch sie besitzen, wie aus den Absorptionsspektren in Abb. 14 hervorgeht, Phycoerythrobilin als Chromophor. Die α-Untereinheiten besitzen jedoch einen Chromophorentyp, der bei 565 nm maximal absorbiert und eine starke Schulter bei 590 nm aufweist. Nach der Lage der Absorptionsbande könnte es sich auf der Basis von Untersuchungen von KÖST et al. (1975) um einen Phycobiliviolin-Chromophor handeln. Eine Biliproteid-Untereinheit mit ähnlichen spektralen Eigenschaften wurde von BRYANT et al. (1976) aus Phycoerythrocyanin, einem neu entdeckten Biliproteid, isoliert. Diese Untereinheit besitzt jedoch bei 590 nm ein Maximum und eine Schulter bei 565 nm. Die β-Untereinheiten von Phycocyanin-645 scheinen diesen Phyco-

biliviolin-Chromophor ebenfalls zu besitzen, jedoch in Kombination mit Phycocyanobilin. Die Maxima bei 350 nm und 663 nm werden durch Phycocyanobilin hervorgerufen, die Maxima bei 334 nm, 605 nm und die Schulter bei 565 nm durch Phycobiliviolin. Die α-Untereinheiten von Phycocyanin-645 absorbieren unter denaturierenden Bedingungen bei 697 nm. Diese sehr langwellige Absorption kann nicht dem Phycocyanobilin zugeordnet werden, das bei ca. 650 nm absorbiert. Es muß vielmehr mit einem bisher unbekannten Chromophor gerechnet werden, der dem Phycobiliverdin oder mehr dem Mesobiliverdin gleichen dürfte.

Die hier beschriebenen Spektren belegen, daß bei den untersuchten Biliproteiden Phycoerythrin-545 und Phycocyanin-645 die α-Untereinheiten die langwellig absorbierenden fluoreszierenden (f) Chromophore tragen, während die β-Untereinheiten die kurzwellig absorbierenden sensibilisierenden (s) Chromophore besitzen. Phycoerythrin-555 trägt nur einen Chromophorentyp, nämlich Phycoerythrobilin, während Phycoerythrin-545 Phycoerythrobilin und Phycobiliviolin enthält. Phycocyanin-645 schließlich besitzt drei unterschiedliche Chromophorentypen, Phycobiliviolin und Phycocyanobilin in der β-Kette und einen dem Biliverdin ähnlichen Chromophor in der α-Kette. Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß die Existenz der fünf bisher gefundenen Phycobilin-Chromophore noch nicht endgültig gesichert ist, da ihre exakten Strukturen und auch ihre Bindungsstellen zum Protein noch nicht völlig aufgeklärt sind (O'CARRA und O'H EOCHA, 1976).

3.1.2.8. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Cryptophyceen-Biliproteide erfolgte durch Gelchromatographie an SEPHADEX G 100, indem die Elutionsvolumina der Biliproteide mit den Elutionsvolumina von Eichproteinen mit definierten Molekulargewichten verglichen wurden (DETERMANN, 1967). Mit Hilfe der in Abb. 16 erstellten Eichgeraden, die die lineare

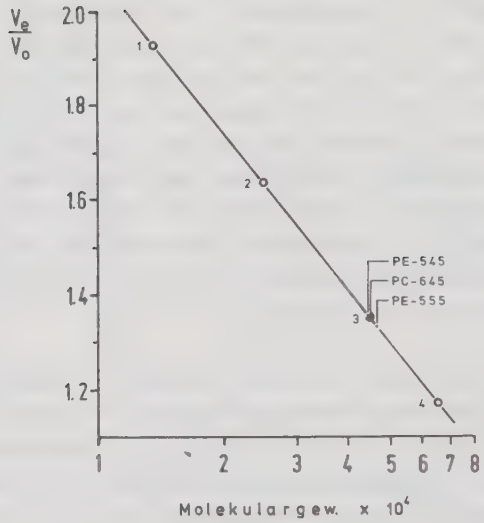


Abb. 16. Molekulargewichtsbestimmung der nativen Biliproteide Phycocyanin-645, Phycoerythrin-555 und Phycoerythrin-545 an SEPHADEX G 100. Eichproteine: 1. Rinderserumalbumin (67 000), 2. Hühnereieralbumin (45 000), 3. Chymotrypsinogen A (25 000), 4. Cytochrom c (13 500). Elutionsmedium: 0,03 M Sörensen-Puffer, pH 7,0.

Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts eines Proteins und seinem Elutionsvolumen demonstriert, können die Molekulargewichte der Biliproteide direkt ermittelt werden. Danach betragen die Molekulargewichte der drei multiplen Phycoerythrin-545 Formen einheitlich 44 500 Dalton. Phycoerythrin-555 und Phycocyanin-645 haben Molekulargewichte von 47 000 und 45 000 Dalton.

Da ein dissoziierendes und aggregierendes Biliproteidsystem von Anfang an nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Molekulargewichtsbestimmungen in mehreren Puffersystemen durchgeführt, die sich in ihren pH-Werten und ihrer Ionenstärke unterschieden. Es zeigte sich, das der pH-Wert und

die Ionenstärke des Elutionspuffers keinen Einfluß auf die Elutionsvolumina der Biliproteide hatten. Isolierung und anschließende Chromatographie der Biliproteide in 0,003, 0,03 und 0,3 M Sörensen-Puffer pH 7,0 und in 0,05 M Natriumazetat-Puffer pH 5,5 ergaben immer ähnliche Elutionsvolumina. Auch eine Abhängigkeit des Molekulargewichts von der Proteinkonzentration im Bereich von 0,5 mg/ml bis 4 mg/ml konnte nicht festgestellt werden. Die Biliproteide wurden immer reproduzierbar als einheitliche, symmetrische Banden von den Trennsäulen eluiert; gefärbte Dissoziationsprodukte, höhermolekulare Aggregate oder isomere Formen traten nicht auf. Die durchgeführten Experimente bestätigen, daß die Biliproteide der Cryptophyceen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine gleichgewichtsabhängigen Aggregations- und Dissoziationsreaktionen eingehen, wie es für die Biliproteide der Blaualgen belegt ist (BERNS, 1971).

Bemerkenswert ist die Einheitlichkeit der Molekulargewichte, die alle im Bereich von 44 500 bis 47 000 Dalton liegen und deshalb ähnliche molekulare Grundstrukturen vermuten lassen. Die an SEPHADEX G 100 ermittelten Molekulargewichte übertreffen bei weitem die Werte, die durch eine bloße Addition der beiden Proteinuntereinheiten gewonnen werden. Sie liegen jedoch innerhalb einer 15 % Varianz der Werte, die durch Addition von je zwei schweren β- und je zwei leichten α-Untereinheiten zustande kommen.

3.1.2.9. Molekulargewichtsbestimmung der Biliproteiduntereinheiten durch Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese

Wurde das Molekulargewicht der nativen Biliproteide durch Gelchromatographie ermittelt, so erfolgte die Bestimmung des Molekulargewichtes und der Anzahl der Proteinuntereinheiten durch SDS-Elektrophorese. Die SDS-Elektropherogramme, die in Abb. 17 dargestellt sind, zeigen, daß die Biliproteide der Cryptophyceen grundsätzlich aus zwei Typen von Polypeptidketten aufgebaut sind: den langsam wandernden schweren β-Untereinheiten und den schnell wandernden

leichten α-Untereinheiten.

Tabelle 3: Molekulargewichte und molare Proportionen der Biliproteiduntereinheiten

Biliproteid	Untereinh.	Molekulargew.	Molare Proportionen
PE-545 (7,83)	α	9 900	α : β = 0,90:1,0
	β	15 700	
PE-545 (5,05)	α	9 900	α : β = 0,83:1,0
	β	15 700	
PE-545 (4,84)	α	9 900	α : β = 0,80:1,0
	β	15 700	
PE-555	α	9 700	α : β = 0,85:1,0
	β	16 500	
PC-645	α_1	10 400	α_1:α_2: β = 0,51:0,47:1,0
	α_2	9 200	
	β	15 500	

Allgemein werden die Untereinheiten der Biliproteide nach ihren Molekulargewichten eingeteilt, wobei die α-Untereinheit das niedrigere und die β-Untereinheit das höhere Molekulargewicht besitzt. Da jedoch einige α-und β-Untereinheiten gleiche Molekulargewichte haben, ist die obige Definition nicht immer anwendbar. Deshalb definierten GLAZER und Mitarbeiter (1976) als α- und β-Untereinheiten die Biliproteidketten, die in ihren N-terminalen Aminosäuresequenzen den α- und β-Ketten von Synechococcus spec. C-Phycocyanin homolog sind. Bei den Cryptophyceen-Biliproteiden ist eine derartige Definition nicht notwendig, da sich α- und β-Ketten signifikant in ihren Molekulargewichten unterscheiden.

Ein Vergleich mit den eingesetzten Eichproteinen (Abb. 18) ergibt für die α- und β-Untereinheiten der untersuchten Biliproteide die in Tabelle 3 aufgeführten Molekulargewichte.

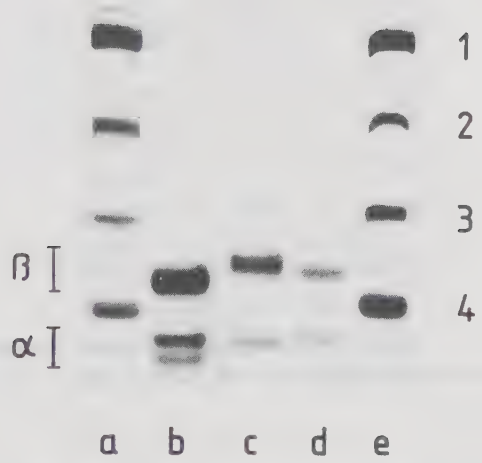


Abb. 17. SDS-Gelelektrophorese der Biliproteide Phycocyanin-645 (b), Phycoerythrin-555 (c) und Phycoerythrin-545 (d). Eichproteine (a, e): 1. Rinderserumalbumin (67 000), 2. Hühnereieralbumin (45 000), 3. Chymotrypsinogen A (25 000), 4. Cytochrom c (12 500).

Beide Phycoerythrine spalten in der SDS-Elektrophorese in zwei Banden auf, so daß eine Klassifizierung der Untereinheiten, wie oben erläutert, sehr leicht ist. Erschwert ist die Einteilung der Untereinheiten von Phycocyanin-645, da in den Pherogrammen drei Banden beobachtet werden. Hier entspricht die langsam wandernde Bande der β-Untereinheit, während die beiden schnell wandernden Banden als α-Untereinheiten betrachtet werden können. Die Zuordnung erfolgt 1. auf Grund der niedrigen Molekulargewichte von 10 400 und 9 200 Dalton und 2. auf Grund ähnlichen spektralen Verhal-

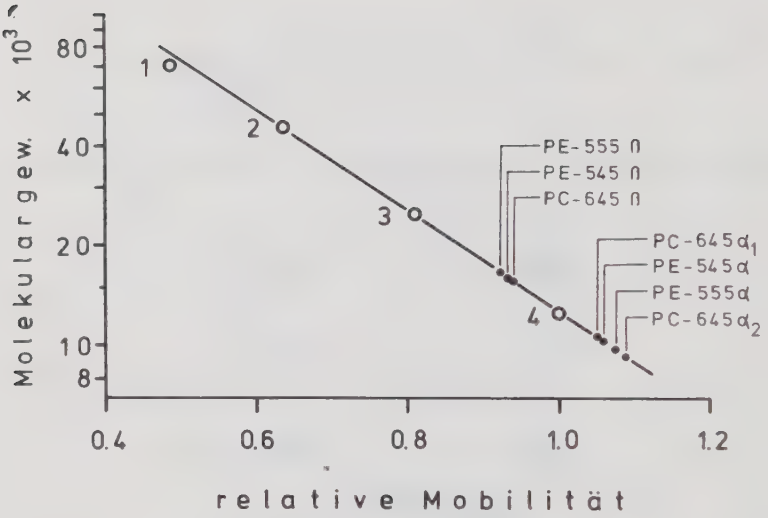


Abb. 18. Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Gelelektrophorese. Eichproteine: siehe Abb. 17.

tens. Beide α-Ketten sind grün gefärbt und absorbieren in SDS-Puffer im sichtbaren Bereich maximal bei 645 nm mit einer Schulter bei 600 nm; die schwere, violett gefärbte β-Kette besitzt bei 560 nm ein Absorptionsmaximum.

In der SDS-Elektrophorese ist eine Unterscheidung der drei multiplen Phycoerythrin-545-Formen nicht möglich, da sie qualitativ und quantitativ das gleiche elektrophoretische Muster zeigen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Molekulargewichtsbestimmungen des nativen Biliproteids, das ebenfalls keine Heterogenität im Molekulargewicht aufweist (Abschn. 3.1.2.8.).

Tabelle 3 zeigt, daß sich sowohl die Molekulargewichte aller α-Untereinheiten untereinander sehr ähnlich sind, wie auch die aller β-Untereinheiten; α- und β-Polypeptidketten unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten von ca.

10 000 Dalton und 16 000 Dalton jedoch sehr deutlich voneinander.

Die Molekulargewichtsbestimmungen wurden in 5 %, 7,5 % und 10 % Gelen mit Vernetzungsgraden von 37:1 und 19:1 durchgeführt. Alle Experimente ergaben innerhalb der Fehlergrenze der Methode übereinstimmende Ergebnisse. Es muß jedoch beachtet werden, daß Polypeptidketten mit Molekulargewichten, die kleiner als 15 000 Dalton sind, vom normalen Verhalten in der Elektrophorese abweichen können, da ihre Form mehr einer Kugel als einem Ellipsoid gleicht und da die Eigenladung ihr Verhalten stärker als normal beeinflussen kann (WEBER et al., 1972).

Die Bandierungsmuster von Phycoerythrin und Phycocyanin änderten sich nicht, wenn Rohextrakte oder gereinigte Biliproteidfraktionen eingesetzt wurden. Sie blieben auch gleich, wenn die Biliproteide zwei Stunden bei 40 °C mit SDS inkubiert wurden oder nur ein bis zwei Minuten bei 100 °C. 2-Mercaptoäthanol als Reduktionsmittel konnte weggelassen werden, ohne das Bandierungsmuster zu verändern. Die einzelnen Untereinheiten der nativen Biliproteidaggregate sind also nicht durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden.

Densitometrische Analysen der mit Coomassie-Blau gefärbten Gele zeigen, daß die α- und β-Untereinheiten in den nativen Biliproteidaggragaten der Cryptophyceen in äquimolaren Verhältnissen vorliegen; demnach ist das Untereinheitenverhältnis für Phycoerythrin-545 und Phycoerythrin-555 $\alpha : \beta = 1 : 1$, für Phycocyanin-645, $\alpha_1 : \alpha_2 : \beta = 0{,}5 : 0{,}5 : 1$. Die relativen molaren Verhältnisse, die nach Normierung auf einheitliche Molekulargewichte, aus den Flächen unter den Dichteprofilen der Gele bestimmt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die für die α-Ketten meist niedriger als 1,0 oder 0,5 liegenden Werte sind durch eine vergrößerte Diffusion auf den längeren Laufstrecken zu erklären.

Auf der Basis eines äquimolaren Verhältnisses der α- und β-Untereinheiten ergeben sich additativ für die Protomere Molekulargewichte von ca. 25 000 Dalton. Unter Berücksich-

tigung der Molekulargewichte der nativen Biliproteide von ca. 46 000 Dalton kann daher für die Cryptophyceen-Biliproteide "in vivo" und "in vitro" ein Dimer mit der allgemeinen Formel $(\alpha\beta)_2$ postuliert werden.

3.2. Feinstrukturelle Untersuchung an den Biliproteiden von Rhodella violacea (Rhodophyceae)

Wie bereits einleitend ausgeführt, besitzen die Cyanobakterien und Rhodophyceen Biliproteide in Form hoch aggregierter Komplexe, den Phycobilisomen, an den äußeren Oberflächen der Thylakoidmembranen. In viel höherem Maße als bei den Cryptophyceen war daher bei der Frage der Untersuchung des Aggregationszustandes der Biliproteide von Rotalgen der Einsatz der Elektronenmikroskopie hier möglich und geboten. Es soll im folgenden gezeigt werden, wie die Feinstrukturanalyse, mit dem in situ-System beginnend, unter Einsatz spezieller Isolations- und Trennverfahren zum in vitro-System isolierter Phycobilisomen fortschreiten und in den molekularen Bereich der Biliproteidaggregation vorstoßen konnte.

3.2.1. Feinstruktur der Biliproteidaggregate von Rhodella violacea "in situ".

Da über die Feinstruktur der Phycobilisomen von Rhodella violacea "in situ" bereits mehrere Publikationen vorliegen (WEHRMEYER, 1971, WEHRMEYER und SCHNEIDER, 1975, MÖRSCHEL et al., 1977), sollen hier nur die wesentlichen Ergebnisse vorgestellt werden. Danach stellen die Phycobilisomen von Rhodella violacea Scheibchen von 6,5 - 7,5 nm Dicke und einem halbkreisförmigen Umriß mit einer Basislinie von etwa 36 - 40 nm und einer Höhe von etwa 29 - 33 nm dar. Die Ultradünnschnitte in Tafel III und IV (Seite 109, 111) zeigen die Phycobilisomen in ihren unterschiedlichen Aspekten. In Schnitten, die parallel zu den Thylakoiden verlaufen, erscheinen die Phycobilisomen als Scheibchen, die senkrecht zur Thylakoidmembran stehen, wobei sie durch Aggregation nach den Flächen Scharen von mehr oder weniger parallel

verlaufenden Säulenreihen ergeben (Tafel IV b, Seite 111). An geordneten Stellen sind dabei Abstände zwischen den einzelnen Phycobilisomen von ca. 13 nm bestimmbar.

Schnitte, die senkrecht zur Thylakoidmembran verlaufen, zeigen die Phycobilisomen in Seitenansicht oder in Frontansicht. In Seitenansichten bilden die Phycobilisomen einen regelmäßigen "Bürstensaum" senkrecht zur Thylakoidoberfläche (Tafel IV a, Seite 111); in Frontansichten stellen die Phycobilisomen halbkreisartige Gebilde dar, die bei starker Vergrößerung eine aufgegliederte Peripherie erkennen lassen (Tafel IV a). Das Modell in Abb. 19 vereinigt die unterschiedlichen Aspekte der Phycobilisomen in den Ultradünnschnitten.

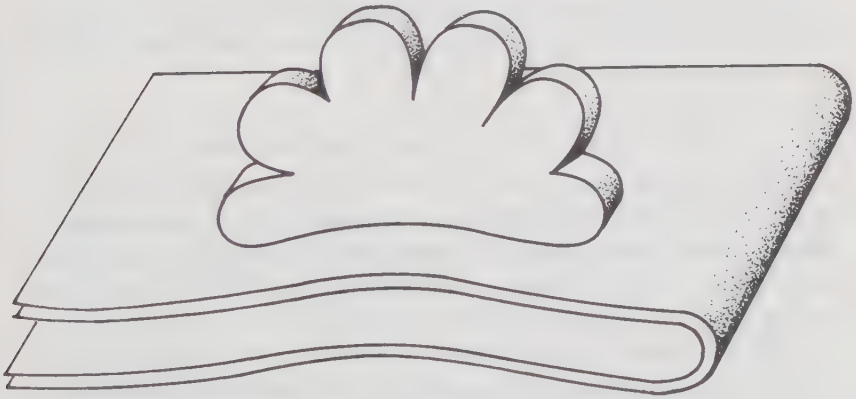


Abb. 19. Modell der Phycobilisomen von Rhodella violacea auf der Basis der unterschiedlichen Aspekte von Ultradünnschnitten.

3.2.2. Feinstruktur der Biliproteidaggregate von Rhodella violacea "in vitro".

Wenngleich es seit den grundlegenden Arbeiten von GANTT und CONTI (1966, 1967) an Porphyridium purpureum (syn. P. cruentum) kaum zweifelhaft erscheint, in den Phycobilisomen den Sitz der Biliproteide einer Zelle zu sehen, war die Isolation der Phycobilisomen aus Rhodella violacea aus verschiedenen Gründen wünschenswert:

1. um den Beweis des Aufbaus der Phycobilisomen von Rhodella violacea aus Biliproteiden zu führen und damit eindeutige Voraussetzungen für alle nachfolgenden Feinstrukturuntersuchungen zu legen,
2. um die Feinstrukturanalyse an intakten isolierten Phycobilisomen unter verbesserten Hochauflösungsbedingungen fortsetzen zu können,
3. um die experimentellen Voraussetzungen für die Aufklärung des molekularen Baus nativer Untereinheiten der Phycobilisomen zu schaffen.

3.2.2.1. Phycobilisomen, Isolation und Fixierung

Da die Ultradünnschnitte keine weitergehende Information über den molekularen Aufbau der Phycobilisomen lieferten, wurden die Untersuchungen an Phycobilisomenfraktionen weitergeführt, die nach dem von KOLLER et al. (1977) entwickelten Verfahren isoliert wurden. Tabelle 4 faßt die wichtigsten Schritte der Aufarbeitung zusammen. Um von einem Verfahren zur Isolation von Phycobilisomen sprechen zu können, war - neben der funktionellen und pigmentanalytischen Charakterisierung - der Nachweis strukturell intakter Phycobilisomen innerhalb der Banden im Saccharosedichtegradienten zu führen.

Die von GANTT und CONTI (1967) zur Vorbereitung der Phycobilisomenisolation aus Porphyridium purpureum anfänglich gewählte Methode der Fixierung des Zellhomogenats mit Glutaraldehyd zur Stabilisierung der Phycobilisomen erwies sich auch bei Rhodella violacea als unbrauchbar. Daher mußte das gesamte Aufschluß- und Isolierungsverfahren unter Bedingun-

Tabelle 4: Isolierung und Präparation der Phycobilisomen von Rhodella violacea

Ernte der Zellen durch Zentrifugation (1100 x g, 7 Min.)
Zweimaliges Waschen und Zentrifugieren in 0,65 M Na-K-phosphatpuffer, pH 7,0

↓

Resuspendieren der Zellen in 0,65 M Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,0

↓

Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung (5 x 30 Sek., Energiestufe 4)

↓

Inkubation des Zellhomogenats mit 1 % Triton X 100 (15 Min.)

↓

Differentielle Reinigungszentrifugation (42 000 x g, 15 Min.)

↓

Auftrennung des Phycobilisomenüberstandes durch Saccharose-dichtegradientenzentrifugation (0,20 - 0,75 M Saccharose, 120 000 x g, 15 Std.)

↓

Elution der Phycobilisomenbande aus dem Dichtegradienten

↓ ↓

Fixierung der Phycobilisomensuspension zur Elektronenmikroskopie (0,1 - 1,0 % Glutaraldehyd)

Präparation der Dreiereinheiten (Abschn. 3.2.3.) und der gereinigten Biliproteide B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin (Abschn. 3.2.5.)

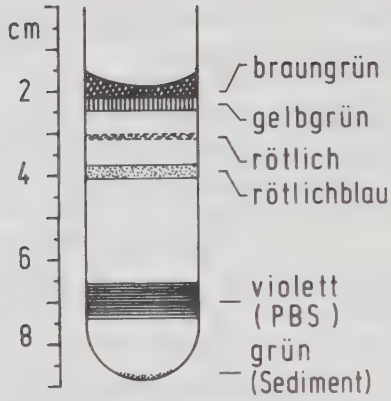


Abb. 20. Bandierungsmuster einer Phycobilisomenisolierung im Saccharosedichtegradienten (Zentrifugation: 15 Std., 120 000 x g). Die isolierten Phycobilisomen (PBS) befinden sich in der schwersten Bande. (Nach KOLLER et al., 1977)

gen durchgeführt werden, die ohne Fixierung eine wesentliche Veränderung der Biliproteidstrukturen unterbinden oder wenigstens einschränken. Dies gelang durch die Wahl eines hochmolaren Phosphatpuffers als Isolationsmedium. Die zur elektronenmikroskopischen Untersuchung im weiteren unumgängliche Fixierung der Biliproteidaggregate erfolgte entweder im Verlauf der Dichtegradientenzentrifugation oder unmittelbar nach der Bandenentnahme. Die spektralphotometrische Analyse der Banden im Saccharosedichtegradienten entsprechend der Abb. 20 weist neben den oberflächennah liegenden Lipidresten Chlorophyll, Carotinoiden und Plastochinon nur je eine schwach rote bzw. rotblau gefärbte Biliproteidbande im oberen Bereich und eine dunkelviolett gefärbte Hauptbande im unteren Bereich des Gradienten auf. Die beiden leichteren, schwächer gefärbten Banden enthalten Fragmente von Phycobilisomen, die aus Phycoerythrin und Phycocyanin bestehen. Diese Fragmente wiesen bei elektronen-

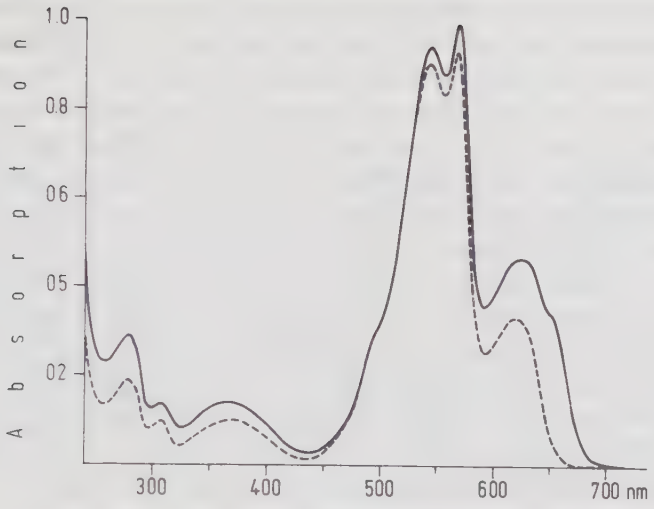


Abb. 21. Absorptionsspektrum von isolierten Phycobilisomen (———) und isolierten Dreiereinheiten (- - -). Lösungsmittel und Referenz: 0,65 M Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,0.

mikroskopischer Kontrolle hauptsächlich scheibchenförmige Biliproteidaggregate und deren Assoziate auf, die in den Abschnitten 3.2.3. und 3.2.5. noch genauer beschrieben werden. Für die tief violette Hauptbande konnte spektralphotometrisch eine Zusammensetzung aus den drei Biliproteiden B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin bewiesen werden. Abb. 21 zeigt das Absorptionsspektrum einer Phycobilisomenfraktion. Die strukturelle Zusammensetzung der Phycobilisomen soll im folgenden beschrieben werden.

3.2.2.2. Phycobilisomen, Feinstruktur und Charakterisierung

Tafel V a (Seite 113) zeigt eine fixierte und anschließend negativ kontrastierte Phycobilisomenfraktion aus der Hauptbande des Saccharosedichtegradienten nach Tabelle 4 im Elektronenmikroskop.

Die wichtigsten **Kriterien**, hier von Phycobilisomen zu sprechen, sind neben der biochemischen und funktionellen Charakterisierung der Fraktion (KOLLER et al., 1977) die folgenden strukturellen Merkmale: der polare Bau der Biliproteidaggregate mit halbkreisförmigem Umriß und gerader Basislinie und die mit der Dimension von "in situ" Phycobilisomen korrespondierenden Meßgrößen isolierter Phycobilisomen. Längenmessungen der beiden ungleichen Achsen der halbkreisförmigen Phycobilisomen ergeben Durchschnittswerte von 53 nm (50 - 62 nm) für die Basis und 33 nm (30 - 40 nm) für die Höhe. Die feststellbaren Abweichungen, die stets zu höheren Zahlenwerten bei isolierten Phycobilisomen hin tendieren, sprechen für eine präparationsbedingte Lockerung der Biliproteidaggregate in diesen Fraktionen. Andererseits sind Schrumpfungsprozesse der Zellstrukturen während der elektronenmikroskopischen Präparation in Betracht zu ziehen.

Tafel V b (Seite 113) zeigt eine Anzahl von ausgewählten Phycobilisomen in guter Strukturerhaltung und Auflösung. Der auffallend einheitliche Aufbau erlaubt es, die Phycobilisomen so anzuordnen, daß ihre Basis nach unten und ihr Scheitel nach oben orientiert sind. Deutlich erkennbar sind der Aufbau der Phycobilisomen aus Untereinheiten unterschiedlicher Orientierung und die Gliederung in Peripherie und Zentrum. Ein Vergleich der Tafeln IV b und V (Seite 111, 113) verdeutlicht die Ähnlichkeit der halbkreisförmigen isolierten Phycobilisomen mit den "in situ" Phycobilisomen der Chloroplasten in Frontansicht.

Obwohl die Zahl der strukturell gut erhaltenen Phycobilisomen die Qualität des Isolationsverfahrens erkennen läßt, sind einzelne Phycobilisomen**fragmente und abgelöste Biliproteidaggregate** nicht zu übersehen. Zwei Ursachen können für die unvollständige Strukturerhaltung einzelner Phycobilisomen angeführt werden:

1. Die Phycobilisomen sind strukturell labile Biliproteidkomplexe. Auch bei Isolation und Gewinnung der Phycobilisomen in stabilisierenden Puffermedien dissoziieren einzelne Biliproteidaggregate ab, wie Abb. 20 zeigt. Dialysiert

man isolierte Phycobilisomen gegen 0,65 M Phosphatpuffer und unterwirft sie einer weiteren Dichtegradientenzentrifugation, so treten neben der schweren Phycobilisomenbande wiederum zwei leichte Banden am oberen Ende des Gradienten auf, die nur Phycoerythrin oder Phycoerythrin und Phycocyanin enthalten.

2. Zu einem größeren Teil ist die auch nach Glutaraldehydfixierung unvollständige Vernetzung der Biliproteidaggregate im Phycobilisom für die Dissoziation einzelner Bestandteile verantwortlich. Die Fixierung mit hohen Glutaraldehydkonzentrationen zwischen 1 % und 4 % führte zu mehr oder weniger starken Vernetzungen der Phycobilisomen untereinander, so daß sichtbare Ausfällungen auftraten. Die wenigen schlecht fixierten solitär liegenden Phycobilisomen zeigen eine deformierte Struktur. Aus diesem Grund mußte mit niedrigeren Glutaraldehydkonzentrationen vernetzt werden, die gleichzeitig die Gefahr einer Dissoziation durch unvollständige Fixierung hervorrufen. Experimente bestätigen diese Vermutung; fixiert man isolierte Phycobilisomen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glutaraldehyd und trennt sie nach Dialyse gegen 0,65 M Phosphatpuffer erneut im Dichtegradienten auf, so findet man Dissoziationsraten der Biliproteide, die von der Konzentration des Vernetzungsmittels abhängig sind. Bei einer schwachen Vernetzung mit 0,01 % Glutaraldehyd sinkt die Absorption der Phycobilisomen im Phycoerythrinbereich um 50 % und im Phycocyaninbereich um 22 %; die Phycobilisomenbande im Dichtegradienten ist deutlich leichter als die der besser fixierten Phycobilisomen. Bei Fixierung mit 0,05 % oder 0,1 % Glutaraldehyd gehen weder Allophycocyanin noch Phycocyanin verloren und die Phycoerythrinabsorption sinkt auf nur noch 68 % bzw. 76 % des ursprünglichen Wertes. Die Experimente zeigen, daß Glutaraldehydkonzentrationen von 0,1 % - 1 % für die Fixierung der isolierten Phycobilisomen am geeignetsten sind, denn sie verhüten weitgehend eine Aggregation der Phycobilisomen untereinander und halten die Dissoziation in befriedigenden Grenzen.

Phycobilisomenzentrum:
Die Phycobilisomen von Rhodella violacea lassen nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure an der Basis ein dreieckiges Zentrum erkennen (Tafel V b, Seite 113). Dies wird von drei ringförmigen Aggregaten eingenommen, die untereinander in Kontakt stehen und ein regelmäßiges Trigon bilden (Tafel V b, Nr. 22 - 28). Im Gegensatz zu den Aggregaten der Peripherie liegen die zentralen Aggregate mit ihren Flachseiten parallel zur Unterstützungsfolie. In Fällen guter Strukturerhaltung beträgt der Durchmesser der ringförmigen Aggregate ca. 9,1 nm.

Da die Phycobilisomenperipherie nach Untersuchungen von KOLLER et al. (1978) nur von Phycoerythrin- und Phycocyaninaggregaten eingenommen wird, ist die Vermutung naheliegend, daß die ringförmigen Aggregate des Zentrums aus Allophycocyanin bestehen. Die elektronenmikroskopische Analyse von gereinigten Allophycocyaninaggregaten (Abschn. 3.2.5.2.) bestätigt die Ähnlichkeit mit den Aggregaten des Phycobilisomenzentrums. Somit nimmt Allophycocyanin auch morphologisch die Schlüsselposition bei der Übertragung der Lichtenergie auf Chlorophyll in den Thylakoiden ein.

Dreiereinheiten als Bausteine der Phycobilisomenperipherie:
Die Peripherie der Phycobilisomen ist aus komplexen Biliproteidzylindern aufgebaut. Sie haben eine Länge von 15 - 17 nm und einen Durchmesser von 8,7 - 9,3 nm und bestehen aus meist drei im Profil sichtbaren scheibchen- oder ringförmigen Aggregaten, die mit ihren Flachseiten aggregiert sind. Da diese Biliproteidzylinder eine distinkte Strukturkomponente des Phycobilisoms darstellen und aus drei Biliproteidaggregaten aufgebaut sind, wurde für sie die Bezeichnung "Dreiereinheit" vorgeschlagen (MÖRSCHEL et al., 1977). Durchweg sechs dieser zylindrischen Dreiereinheiten bilden in regelmäßiger radialer Anordnung einen Halbkreis (Tafel V b, Seite 113). Ablösungen scheibchenförmiger Aggregate der Dreiereinheiten und ganzer Dreiereinheiten können die Symmetrie der Phycobilisomenperipherie beeinträchtigen (Tafel V b, Nr. 3, 12). Die beiden Flanken der Phycobili-

somen werden von je zwei parallel liegenden Dreiereinheiten eingenommen, die während der Präparation fast nie Teile verlieren; vermutlich stabilisieren sie sich auf Grund ihrer parallelen Orientierung. Der obere Teil der Peripherie ist von zwei weiteren Dreiereinheiten besetzt, die, radial angeordnet, untereinander einen stumpfen Winkel bilden. Sie werden während der Phycobilisomenisolierung offensichtlich mehr in Mitleidenschaft gezogen als die Dreiereinheiten der Basis und der Mittelposition; immerhin fanden sich in diesen Positionen 76 % - 78 % unversehrte vollständige Dreiereinheiten. Die Erhaltung der Dreiereinheiten in Scheitelposition scheint um so besser zu sein, je größer der Kontakt zu den parallel liegenden Dreiereinheiten der Mittelposition und der Basis ist (Tafel V b, Nr. 1, 13, 14). Da die hier angewandte Analysenmethode statisch ist und keine physiologisch bedingten Umbau-Aufbau- oder Abbauvorgänge erfaßt, bleibt es eine offene Frage, ob Zylinder, die nur aus zwei Biliproteidaggregaten bestehen, Artefakte darstellen oder native Bestandteile der Phycobilisomen sind.

3.2.3. Dreiereinheiten, Isolation und Charakterisierung

3.2.3.1. Isolation und Fixierung

Da die Dreiereinheiten dominierend am Aufbau der Phycobilisomen beteiligt sind, war ihre biochemische, funktionelle und weitergehende strukturelle Charakterisierung wünschenswert.

Voraussetzung dazu war ihre Isolierung als reine Fraktion. In Weiterentwicklung des Verfahrens der experimentell kontrollierten Dissoziation isolierter Phycobilisomen von Porphyridium purpureum nach GANTT et al. (1976) gelang es KOLLER et al. (1978), auch bei Rhodella violacea Bruchstücke von Phycobilisomen zu erhalten und durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten aufzutrennen. Tabelle 5 faßt die wichtigsten Präparationsschritte zusammen. Die beiden etwa im Bereich von 0,26 - 0,32 M Saccharose liegenden violetten Banden erwiesen sich auf Grund biochemischer und

Tabelle 5: Isolierung und Präparation der Dreiereinheiten aus Phycobilisomen von Rhodella violacea

↓

Isolation der Phycobilisomen durch Dichtegradientenzentrifugation (Abschn. 3.2.2.1.). Elution der Phycobilisomenbande

↓

Anreicherung der Phycobilisomensuspension durch Ultrafiltration

↓

Kontrollierte partielle Dissoziation der Phycobilisomen an SEPHADEX G 25 durch Erniedrigung der Ionenstärke

↓

Über Nacht stehen lassen zur Vervollständigung der Dissoziationsreaktionen

↓

Auftrennen des Phycobilisomendissoziats durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation (0,15 - 0,35 M Saccharose, 0,65 M Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,0; 113 000 x g, 14 Std.)

↓

Elution des schweren Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplexes (Fraktion der Dreiereinheiten) aus dem Dichtegradienten

↓

Fixierung der Dreiereinheitensuspension zur Elektronenmikroskopie im Negativkontrast mit Glutaraldehyd (0,05 - 1,0 %)

spektralphotometrischer Analysen als ausschließlich phycoerythrin- und phycocyaninführend, wie es durch das Absorptionsspektrum der Dreiereinheit in Abb. 21 überzeugend gezeigt wird. Aus Fluoreszenzemissionsspektren konnte zudem geschlossen werden, daß ein Energietransfer von Phycoerythrin nach Phycocyanin stattfindet und somit ein räumlich enger Kontakt zwischen den beiden Biliproteiden bestehen dürfte (KOLLER et al., 1978). Um diese indirekten Vorstellungen abzusichern und den Aggregationszustand der Biliproteide direkt zu erfassen, kamen als Untersuchungsmittel die Ultrazentrifuge und das Elektronenmikroskop in Frage. Es wurde hier hauptsächlich die Elektronenmikroskopie eingesetzt, um den "schwersten" Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplexe zu untersuchen. Bei der damit verbundenen Aufgabe optimaler Fixierung der Biliproteide im vorgegebenen Aggregationszustand der Banden tauchten die schon oben bei der Fixierung isolierter Phycobilisomen angesprochenen Schwierigkeiten auf. Hohe Glutaraldehydkonzentrationen konnten zu artifizieller Aggragatbildung führen, zu geringe andererseits die nativen Biliproteidaggregate nicht oder nicht quantitativ stabilisieren. Präparationen der Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplexe, die ohne vorhergehende Fixierung nach Phosphorwolframsäurekontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht wurden, bestanden nur aus einzelnen Biliproteidscheibchen in Frontansicht und ließen keine höheren Aggregatformen erkennen.

Als Kompromißlösung wurde mit 0,05 - 1,0 % Glutaraldehyd fixiert. Selbst so fixierte Biliproteidaggregate lieferten bei wiederholter Dichtegradientenzentrifugation nicht nur die erwartete "schwere" Bande des Komplexes, sondern stets zusätzlich "leichtere" Banden der Dissoziationsprodukte Phycoerythrin und Phycocyanin. Daraus kann geschlossen werden, daß die Glutaraldehydixierung in der angewandten Konzentration zwar nicht zu artifizieller Vernetzung der Biliproteidkomplexe führt, aber auch nicht die Komplexe quantitativ stabilisiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen können daher nicht quantitativ repräsentativ sein, sondern nur ein qualitatives Bild des Ordnungszustands der

Fraktion des Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplexes liefern.

3.2.3.2. Feinstruktur und Charakterisierung

In Tafel VI (Seite 115) sind daher als Dissoziationsprodukte der Biliproteidkomplexe scheibchenförmige Biliproteidaggregate in Flächenansicht mit einem Durchmesser von 8,7 - 13,0 nm zu sehen. Es dominieren aber erwartungsgemäß die Biliproteidkomplexe; sie lassen ihren Aufbau aus zwei und vielfach auch drei scheibchenförmigen Aggregaten in Profilansicht deutlich erkennen. Die an diesen zylindrischen Biliproteidkomplexen durchgeführten Messungen ergaben Längen von 15 bis 16 nm und einen Durchmesser von 8,7 nm. Die Dicke der Einzelscheibchen lag bei guter Strukturerhaltung bei 3,9 nm. Die Abstände von Scheibchen zu Scheibchen schwanken geringfügig und liegen bei 1,2 bis 2,0 nm. Damit ähnelt der hier vorgestellte Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplex in seiner Morphologie und Dimension den Dreiereinheiten, die als native Strukturkomponente der Phycobilisomen oben beschrieben wurden. Da der Phycoerythrin-Phycocyanin-Komplex sich unmittelbar von den Phycobilisomen von Rhodella violacea ableiten läßt und die Untersuchungsmethode sekundäre Umlagerungen der Biliproteide weitgehend ausschließt, ist er sehr wahrscheinlich mit den Dreiereinheiten der Phycobilisomen identisch.

3.2.4. Phycobilisomenmodell

Aus der räumlichen Darstellung in Abb. 19 auf Grund unterschiedlich orientierter Ultradünnschnitte und den Ergebnissen der Negativkontrastuntersuchungen zur Molekularstruktur an isolierten Phycobilisomen (Tafel V), kann das in Abb. 22 dargestellte Modell konstruiert werden. Es zeigt den strukturellen Aufbau des Phycobilisoms aus einzelnen, miteinander verbundenen Biliproteidaggregaten, die hier nur schematisch dargestellt sind. Zur statistischen Absicherung des Modells wurden über hundert gut erhaltene Phycobilisomen ausgewertet. Das Modell bezieht sich nur auf die Phycobilisomen von Rhodella violacea. Durch die dichte Packung der Biliproteidaggregate genügt es den Anforderungen eines

Abb. 22. Modell der Phycobilisomen von Rhodella violacea. Die molekulare Organisation der hier scheibchenförmig ausgeführten Biliproteidaggregate ist der Übersicht halber weggelassen.

effektiven Energietransfers; weiterhin ist es in Bezug auf chromatische Adaptation variabel, da ohne Änderungen der Grundstruktur ein Austausch und ein An- und Abbau von Biliproteidaggregaten erfolgen kann.

3.2.5. Struktur der Biliproteidaggregate C-Phycocyanin, Allophycocyanin und B-Phycoerythrin

3.2.5.1. Aggregate der Dreiereinheiten

Bei der Strukturaufklärung der Biliproteidaggregate ist es von Vorteil, daß sie sich gelegentlich aus dem Verband der Dreiereinheiten lösen und einzeln liegen. Die Durchmesser dieser Einzelaggregate betragen in Abhängigkeit von ihrer

Strukturerhaltung 9,2 - 13,0 nm. Damit ist der Durchmesser der Einzelaggregate in Frontansicht größer, als der Durchmesser der Einzelaggregate in Profilansicht im Verband der Dreiereinheit. Die Ursache dieser Größendifferenzen kann sowohl in der ungleichen Dichteverteilung des Negativkontrastmittels um die Aggregate herum, als auch in der Struktur der Aggregate selbst begründet sein. So stabilisieren sich die Biliproteidaggregate im Verband der Dreiereinheit wahrscheinlich selbst und bleiben relativ kompakt, während die Untereinheiten der Einzelaggregate in Frontansicht zu einem gewissen Grad auseinanderweichen können. Die Lockerung und das Auseinanderweichen der Untereinheiten in Verbindung mit dem Eindringen des Negativkontrastmittels zwischen die Substrukturen erleichtert die molekulare Analyse. Neben kompakten scheibchenförmigen Aggregaten, die keine sichtbare Substruktur aufweisen, findet man ringförmige Strukturen mit einem kontrastreichen zentralen Hohlraum einerseits und ringförmige Aggregate mit zusätzlich deutlich abgegrenzter zentraler Struktur andererseits (Tafel VI, Seite 115). Beide Aggregate besitzen eine ringförmige Peripherie aus globulären Proteinuntereinheiten.

Die Struktur der abdissoziierten Biliproteidaggragate in Frontansicht ist ein direkter Beweis für die scheibchen- oder ringförmige Natur der Aggregate der Dreiereinheiten, die im Verband nur im Profil sichtbar sind. Auch die Aggregate der Dreiereinheiten lassen eine Feinstruktur erkennen, die auf einen Aufbau aus Untereinheiten hindeutet. Eine grosse Zahl von Dreiereinheiten in Tafel VI zeigt Längsfurchen und Querfurchen von eingedrungenem Negativkontrastmittel, wie es in Abb. 23 schematisch dargestellt ist. Dieses Muster kann nur so interpretiert werden, daß die Biliproteidaggregate der Dreiereinheiten ihrerseits aus zwei aggregierten schmäleren Ringen oder Scheibchen aufgebaut sind, die aus globulären Proteinuntereinheiten bestehen; es resultiert somit eine "Sandwich-Struktur" der Aggregate der Dreiereinheiten. Da die Querfurchen nicht immer ganz parallel zu den Schmalseiten der Aggregate verlaufen, sind die Untereinheiten der beiden Ringe oder Scheibchen, die die

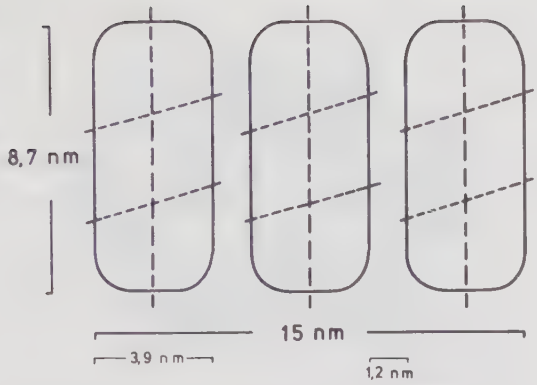


Abb. 23. Schematische Darstellung der Dreiereinheit. Die gestrichelten Linien zeigen die Zonen des in die Aggregate eingedrungenen Negativkontrastmittels.

Biliproteidaggregate der Dreiereinheiten aufbauen, wahrscheinlich in einem gewissen Winkel gegeneinander versetzt angeordnet.

Einige Aggregate der Dreiereinheiten sind zentral durch eingedrungenes Negativkontrastmittel quergeteilt; dies ist in Profilansicht ein Hinweis für die ringförmige Natur einiger Aggregate.

3.2.5.2. Struktur der isolierten Biliproteidaggregate

Die Untersuchungen am Phycobilisom und der Dreiereinheit ließen es wünschenswert erscheinen, die isolierten und gereinigten Biliproteide Allophycocyanin, C-Phycocyanin und B-Phycoerythrin elektronenmikroskopisch zu untersuchen, um die Struktur der Biliproteidaggregate aufzuklären.

Nach spektroskopischer und elektrophoretischer Reinheitskontrolle wurden die Biliproteide von Rhodella violacea in Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mg/ml Protein nach Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht. Die Tafeln VII, VIII und IX (Seite 117 - 121) zeigen typische Aus-

schnitte aus negativkontastierten Präparaten der reinen Biliproteide. Die Biliproteide liegen unter den gewählten Isolationsbedingungen (pH-Wert: 7,0, Ionenstärke: 0,03, Proteinkonzentration 0,1 - 0,5 mg/ml überwiegend als Einzelaggregate vor, die auf Grund ihrer Achsenverhältnisse mit ihren Flachseiten parallel zum Unterstützungsfilm liegen und dem Betrachter die Frontansicht zeigen. Alle Biliproteidaggregate von Rhodella violacea haben eine ring- oder scheibchenförmige Struktur und sind offensichtlich nach ähnlichen Bauprinzipien aus Untereinheiten aufgebaut. Sekundäre Aggregationen, wie sie für höhere Proteinkonzentrationen und pH - Werte in der Nähe des isoelektrischen Punktes für C-Phycocyanin von EISERLING und GLAZER (1974) beschrieben wurden, scheinen unter den gewählten Bedingungen nicht vorzukommen. Nur in den Präparationen von B-Phycoerythrin (Tafel IX) findet man häufiger aus zwei Scheibchen bestehende, komplexe Aggregate, die mit ihren Flachseiten aneinandergelagert sind. Derartige Aggregate findet man in den gereinigten Fraktionen von C-Phycocyanin und Allophycocyanin nur sehr selten oder überhaupt nicht.

Phycocyanin:
Tafel VII (Seite 117) zeigt, daß C-Phycocyanin einheitlich aus Aggregaten aufgebaut ist, die eine ringförmige Struktur besitzen.

Der äußere Durchmesser der Phycocyaninaggregate beträgt 10,5 nm, der innere Durchmesser ca. 2,3 nm. Der Biliproteidring ist eindeutig perlkettenartig aus globulären Proteinuntereinheiten aufgebaut, deren Anzahl auf der Basis von gut aufgelösten und gut erhaltenen Aggregaten auf sechs geschätzt werden kann. Da alle Proteinuntereinheiten eines Biliproteidaggregates eine gleichmäßige Kontrastierung aufweisen und bei benachbarten Untereinheiten keine Inhomogenitäten in der Kontrastverteilung auftreten, kann vermutet werden, daß der Ring planar gebaut ist und die Untereinheiten in der Ebene nicht gegeneinander versetzt angeordnet sind.

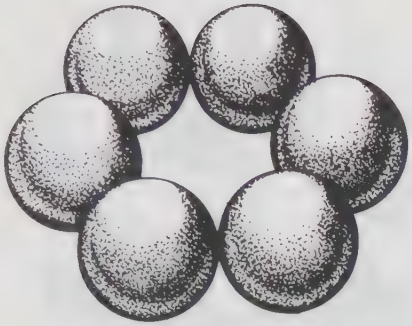


Abb. 24. Strukturmodell eines trimeren C-Phycocyanin- oder Allophycocyaninaggregates. Die Untereinheiten sind idealisiert kugelförmig dargestellt.

Auf der Basis der elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann für die isolierten C-Phycocyaninaggregate ein Strukturmodell entwickelt werden, das in Abb. 24 dargestellt ist. Die Proteinuntereinheiten sind idealisiert als Kugeln gezeichnet; weiterhin wird zwischen α- und β-Untereinheiten nicht unterschieden, da sie ähnliche Dimensionen besitzen.

In Regionen mit einer dichten Verteilung des Negativkontrastmittels oder in unmittelbarer Nachbarschaft zu den ringförmigen Aggregaten von C-Phycocyanin sind in einigen Fällen feine lineare Strukturen sichtbar, die Profilansichten der ringförmigen Aggregate oder aber aufgebrochene Ringe darstellen könnten. Ihre Dicke beträgt ca. 2,3 nm und ihr Durchmesser 10,2 bis 13,0 nm. Wenn diese feinen linearen Strukturen in der Tat Profilansichten von Phycocyaninaggregaten sind, dann beträgt die Dicke eines Phycocyaninaggregates ca. 2,3 nm. Die C-Phycocyaninaggregate scheinen also halb so dick zu sein wie die Biliproteidaggregate der Dreiereinheiten im Profil. So kann auf der Basis der "Sandwich-Struktur" der Aggregate der Dreiereinheit vermutet werden, daß zwei der hier vorge-

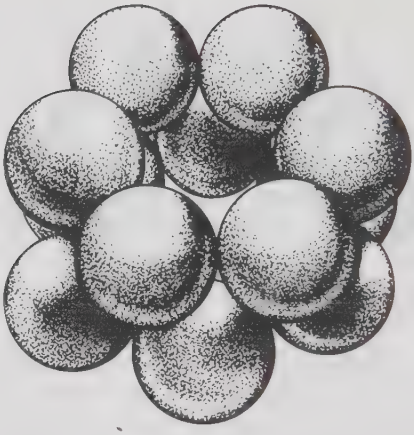


Abb. 25. Modell eines hexameren C-Phycocyaninaggregates, wie es im Phycobilisom und den isolierten Dreiereinheiten vorliegen könnte.

stellten C-Phycocyaninringe mit ihren Flachseiten aggregieren und ein Aggregat der Dreiereinheit mit der Dicke von 4,0 nm bilden. Die Untereinheiten in den beiden aggregierten Ringen scheinen eine alternierende Position einzunehmen, so daß eine dichte Packung resultiert, wie die Aufnahmen der Dreiereinheiten im Profil zeigen (Tafel VI). Abb. 25 zeigt das Modell eines Phycocyaninaggregates, wie es in den Dreiereinheiten vorliegen könnte.

Allophycocyanin:
Die Allophycocyaninaggregate in Tafel VIII (Seite 119) sind ähnlich gebaut wie die Phycocyaninaggregate; sie besitzen ebenfalls eine ringförmige Struktur, die aus globulären Proteinuntereinheiten besteht. Im Elektronenmikroskop ergeben die Allophycocyaninaggregate jedoch einen etwas geringeren Kontrast, so daß sie kaum sichtbar sind. Neben vollständig erhaltenen Allophycocyaninringen, die die Masse der sichtbaren Strukturen ausmachen, findet man in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen deformierte Ringe und aufgebrochene

Ringe, die linear auf der Unterstützungsfolie liegen oder ein annähernd U-förmiges Aussehen haben. Der äußere Ringdurchmesser der Allophycocyaninaggregate ist 9,8 nm, der innere Ringdurchmesser ca. 3,2 nm; die Dicke der Aggregate beträgt ca. 3,0 nm. Sie kann wie bei C-Phycocyanin aus Aggregaten ermittelt werden, die in Profilansicht sichtbar sind, oder an aufgebrochenen Ringen, die als kettenartige Gebilde flach auf dem Unterstützungsfilm liegen. Die Allophycocyaninringe sind wie C-Phycocyanin aus Proteinuntereinheiten aufgebaut, deren Zahl bei Aggregaten in guter Auflösung ebenfalls auf sechs geschätzt werden kann. Auf Grund der ähnlichen Struktur ist für die Allophycocyaninaggregate das gleiche Modell wie für die isolierten C-Phycocyaninaggregate (Abb. 24) zu postulieren.

Phycoerythrin:
Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Phycoerythrin (Tafel IX, Seite 121) zeigen sowohl Aggregate in Frontansicht, als auch Aggregate im Profil. Im Gegensatz zu C-Phycocyanin und Allophycocyanin, deren Aggregate ringförmig gebaut sind, haben die mit der Flachseite zum Betrachter liegenden B-Phycoerythrinaggregate eine scheibchenförmige Struktur mit einem Durchmesser von 11,3 nm. Der Durchmesser der im Profil sichtbaren Phycoerythrinaggregate stimmt mit dem Durchmesser der in Frontansicht liegenden Aggregate gut überein; die Dicke eines Aggregates beträgt, im Profil gemessen, 4,0 nm. Sie ist damit ca. doppelt so groß wie die Dicke eines C-Phycocyaninaggregates (2,3 nm) und auch größer als die Dicke eines Allophycocyaninaggregates (3,0 nm). Die im Profil sichtbaren B-Phycoerythrinaggregate treten immer gepaart auf; die Länge eines derartigen aus zwei B-Phycoerythrinaggregaten bestehenden zylindrischen Biliproteidkomplexes ist 10,1 nm, bei einem konstanten Abstand der Aggregate von ca. 2,0 nm. Sie ähneln damit den Komplexen aus zwei scheibchenförmigen Aggregaten, die bei der Dissoziation von Phycobilisomen gewonnen werden (siehe Abschnitt 3.2.3.).

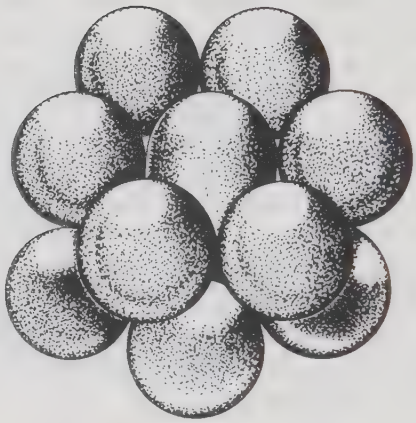


Abb. 26. Modell eines hexameren B-Phycoerythrinaggregates; die Y-Untereinheit liegt zentral, α- und β-Untereinheiten bilden die ringförmige Peripherie.

Die Strukturanalyse der B-Phycoerythrinaggregate ist erschwert, da sie kompakt gebaut und dicker sind als die Aggregate von C-Phycocyanin und Allophycocyanin. In Frontansichten der Aggregate ist deutlich eine ringförmige, aus Proteinuntereinheiten zusammengesetzte Peripherie zu erkennen, die um eine zentrale Untereinheit gruppiert ist. Bei Phycocyanin- und Allophycocyaninaggregaten fehlt diese zentrale Untereinheit. Die Anzahl der peripheren Untereinheiten ist schwer feststellbar und schwankt, durch Superimposition hervorgerufen, zwischen sechs und elf. Durch die Kombination der strukturellen Daten aus Profil- und Frontansichten ist es in Verbindung mit den Studien an den Dreiereinheiten möglich, die B-Phycoerythrinaggregate zu rekonstruieren.

In ihren Dimensionen stimmen die Aggregate von gereinigtem B-Phycoerythrin gut mit den Aggregaten der Dreiereinheiten überein. Es kann vermutet werden, daß die gereinigten B-Phycoerythrinaggregate in der gleichen Struktur und Aggregationsform vorliegen wie im Phycobilisom und der isolierten

Dreiereinheit. Da B-Phycoerythrin einen ähnlichen Durchmesser wie C-Phycocyanin hat und die Molekulargewichte der durch SDS-Elektrophorese ermittelten Untereinheiten sich nicht wesentlich von den C-Phycocyaninuntereinheiten unterscheiden, kann ein ähnlicher Bau der Peripherie wie bei C-Phycocyanin angenommen werden.

B-Phycoerythrin ist wahrscheinlich "sandwichartig" aus zwei Proteinringen aufgebaut, die in Homologie zu C-Phycocyanin aus je sechs Biliproteiduntereinheiten von 18 - 19 000 Dalton bestehen. Beide Ringe werden durch eine zentral liegende Untereinheit, wahrscheinlich die Phycourobilin tragende γ-Untereinheit (GLAZER und HIXSON, 1977), wie von einer Achse zusammengehalten; das Molekulargewicht dieser Untereinheit beträgt 29 - 30 000 Dalton (KOLLER und WEHRMEYER, 1975). Durch diese Struktur kann auch die Stabilität des "sandwichartigen" B-Phycoerythrinaggregates von 4,0 nm Dicke erklärt werden, das im Gegensatz zu C-Phycocyaninaggregaten nicht merklich in 2,3 nm Aggregate dissoziiert. Abb. 26 zeigt die für B-Phycoerythrin von Rhodella violacea vorgeschlagene Struktur im Modell.

3.2.6. Molekulargewichtsbestimmung der Einzelaggregate der Dreiereinheit und der gereinigten Biliproteide

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen läßt sich "a priori" nicht eindeutig bestimmen, in welcher Aggregationsstufe die Biliproteidaggregate in den Phycobilisomen, den Dreiereinheiten und bei den gereinigten Pigmenten vorliegen und welches Partikelgewicht sie besitzen. Die biochemischen Molekulargewichtsbestimmungen, die sehr zuverlässig sind, ergeben in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Proteinkonzentration komplexe Bandierungsmuster, die nur sehr schwer mit den im Elektronenmikroskop sichtbaren Biliproteidaggregaten korreliert werden können (LEE und BERNS, 1968, KESSEL et al., 1973). Deshalb wurde auf der Basis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Schätzung des Partikelgewichtes vorgenommen. Hierbei müssen Schrumpfungsprozesse bei der elektronenmikroskopischen Präparation

und Kontrastgradienten in den Randzonen der Proteine berücksichtigt werden, die die Größe der Aggregate und damit das Partikelgewicht beeinflussen. Das Verhältnis von Volumen zu Partikelgewicht bei globulären Proteinen wird von ZIPPER und KRATKY (1971) mit 1,37 ± 0,12 $Å^3$/Dalton angegeben, ein Mittelwert, der aus den bekannten Dimensionen und Molekulargewichten zahlreicher Proteine gewonnen wurde.

Das Partikelgewicht eines idealisierten, zylindrischen Biliproteidaggregates innerhalb einer Dreiereinheit, von 9,0 x 4,0 nm liegt demnach bei 186 000 ± 23 000 Dalton und das der abdissoziierten Einzelaggregate von ca. 12,0 x 4,0 nm bei 330 000 ± 32 000 Dalton. Dabei ist anzunehmen, daß das tatsächliche Partikelgewicht zwischen den beiden ermittelten Werten liegt. Somit ist das Partikelgewicht der in der Dreiereinheit vorliegenden Biliproteidaggregate eindeutig schwerer als die Partikelgewichte von Biliproteiden, die in trimerer Aggregationsstufe $(\alpha\beta)_3$ vorliegen und Molekulargewichte zwischen 103 000 und 139 000 Dalton haben (GLAZER, 1976). Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann deshalb vermutet werden, daß die drei jeweils aus Doppelscheibchen bestehenden, "sandwichartigen" Biliproteidaggregate der Dreiereinheiten Hexamere der Formeln $(\alpha\beta)_6$ und $(\alpha\beta)_6\gamma$ darstellen. Die Molekulargewichtsbestimmungen der gereinigten Biliproteidaggregate stützen diese Annahme. C-Phycocyanin, mit den Maßen 10,5 x 2,3 nm, besitzt ein Partikelgewicht von 138 000 ± 13 000 Dalton und ist demnach eindeutig ein trimeres Aggregat der Zusammensetzung $(\alpha\beta)_3$; für Allophycocyanin kann ein Partikelgewicht von 147 000 ± 14 000 Dalton bestimmt werden, das ebenfalls der trimeren Aggregationsstufe entspricht.

Im Phycobilisom und der Dreiereinheit liegt C-Phycocyanin als hexamerer Doppelring vor, der eine Dicke von 4,0 nm und ein Partikelgewicht von 240 000 ± 24 000 Dalton aufweist. Das Partikelgewicht der gereinigten B-Phycoerythrinaggregate von 292 000 ± 29 000 Dalton und ihre Größe von 11,3 x 4,0 nm beweisen, daß Phycoerythrin sowohl in den gereinigten Fraktionen als auch im Verband der nativen Strukturen, dem Phy-

cobilisom und der Dreiereinheit, in der hexameren Aggregationsstufe $(\alpha\beta)_6\gamma$ vorliegt. Die auf der Basis von Volumensmessungen ermittelten Partikelgewichte der Biliproteidaggregate stimmen gut überein mit den bei Rhodella violacea von KOLLER und WEHRMEYER (1974, 1975) gefundenen Molekulargewichten von 130 000 und 139 000 Dalton für Allophycocyanin und C-Phycocyanin und von 280 000 und 265 000 Dalton für B-Phycoerythrin. Berücksichtigt man die von KOLLER et al. (1978) angegebene Zusammensetzung der Dreiereinheit aus B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin im Verhältnis 2 : 1, dann resultiert auf der Basis der Volumensmessungen ein Partikelgewicht von 824 000 $\pm$ 82 000, und auf der Basis der gelchromatographischen Daten, ein Partikelgewicht von 823 000 Dalton.

4. DISKUSSION

Die Biliproteide der Rhodophyceen, Cyanobakterien und Cryptophyceen sind sehr wahrscheinlich eine homologe Pigmentfamilie, die sich in ihren biochemischen, immunologischen und physiologischen Eigenschaften sehr ähnlich sind (GLAZER und APELL, 1977). Allgemein sind die Biliproteide dieser drei Algengruppen aus zwei Untereinheiten α und β aufgebaut, die sich in ihren Aminosäuresequenzen und folglich auch in ihren Molekulargewichten unterscheiden (GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1971). Im Verlauf der Evolution haben die Biliproteide der Rhodophyceen und Cyanobakterien einerseits und die Biliproteide der Cryptophyceen andererseits eine divergierende Entwicklung erfahren, die vor allem ihr Aggregationsverhalten und damit verbunden ihre intrazelluläre Lokalisation nachhaltig beeinflußte, ohne jedoch die gemeinsamen physiologischen Eigenschaften zu verändern. Während bei Rhodophyceen und Cyanobakterien mindestens zwei Biliproteide in hohen Aggregationsstufen vorliegen, die in distinkten morphologischen Gebilden, den Phycobilisomen, in regelmäßigen Mustern auf den äußeren Thylakoidoberflächen angeordnet sind, besitzen die Cryptophyceen jeweils nur ein Biliproteid mit niedrigem Aggregatgewicht, das intrathylakoidal lokalisiert sein dürfte.

Ungewißheit bestand lange Zeit über die Molekulargewichte und die Aggregationsformen der Cryptophyceen-Biliproteide, die nicht in das Protomer-Trimer-Hexamer-Aggregationsschema der Cyanobakterien- und Rhodophyceen-Biliproteide hineinpassen wollten. Es wurden generell Molekulargewichte gefunden, die zum Teil weit unter 40 000 Dalton lagen. So konnten für Phycoerythrin-555 ein Molekulargewicht von 30 800 Dalton ermittelt werden (BROOKS und GANTT, 1973), für Phycoerythrin-555 27 800 Dalton (NOLAN und O'H EOCHA, 1967) und für Phycoerythrin-566 Werte von 35 000 und 30 900 Dalton (GLAZER et al., 1971, BROOKS und GANTT, 1973). Berücksichtigt man die Molekulargewichte der α- und β-Ketten von ca. 10 000 und 17 000 Dalton, dann entsprechen die er-

mittelten Aggregatgewichte der Cryptophyceen-Biliproteide eindeutig einer protomeren Struktur ($\alpha\beta$), die bei Rhodophyceen- und Cyanobakterien-Biliproteiden die kleinste nicht denaturierte funktionelle Einheit darstellt.

Die vorliegende Untersuchung und frühere Studien (MÖRSCHEL und WEHRMEYER, 1975, 1977) können diese einfache protomere Struktur im Sinne von MONOD et al. (1965) nicht bestätigen. Für drei Cryptophyceen-Biliproteide wurde eindeutig gezeigt, daß ihre Aggregatgewichte im Bereich von oder über 50 000 Dalton liegen. Bei einem äquimolaren Verhältnis der Untereinheiten und Molekulargewichten der α-und β-Ketten von ca. 10 000 und 16 000 Dalton kann nur eine dimere Struktur der Formel $(\alpha\beta)_2$ mit den gefundenen Aggregatgewichten in Übereinstimmung gebracht werden. Kleinere oder höhere Aggregatgewichte, die gleichgewichtsabhängige Aggregations- oder Dissoziationsreaktionen anzeigen, konnten nicht beobachtet werden, selbst wenn der pH-Wert, die Ionenstärke des Elutionspuffers oder die Biliproteidkonzentration geändert wurden.

Auch die multiplen Biliproteidformen, die in der isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt werden können und bisher mit Ausnahme von Phycocyanin-615 (GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1975) bei allen Cryptophyceen-Biliproteiden gefunden wurden, stellen keine Aggregationsformen der Untereinheiten in wechselnder Stöchiometrie dar. Die von einigen Autoren (GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1975) angenommenen, nach dem Muster $\alpha\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha\beta_2$, $\alpha_2\beta_2$.... gebildeten Aggregationsformen stellen vielmehr Untereinheitenisomere dar, die auf bloße Unterschiede in den Polypeptidketten zurückzuführen sind.

In jüngerer Zeit konnten die hier vorgelegten Ergebnisse durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt werden; für Phycocyanin-615, Phycocyanin-645, Phycoerythrin-545 und Phycoerythrin-566 wurden Aggregatgewichte von 57 000, 54 300, 53 000 und 53 000 Dalton gefunden (GLAZER und COHEN-BAZIRE, 1975, MAC COLL et al., 1976). In der Ultrazentrifuge konnten

keine zusätzlichen Banden entdeckt werden, die auf ein aggregables System hinweisen. Mit hoher Sicherheit ist zu vermuten, daß die Biliproteide der Cryptophyceen auch "in vivo" keine feste Aggregation zu hochmolekularen Verbänden eingehen, da 1. stabilisierende Agenzien wie Carbowax, Polyäthylenglycoll oder FICOLL keine höheren Aggregate konservieren, wie es bei Cyanobakterien der Fall ist (SUSOR und KROGMANN, 1964), 2. Medien hoher Ionenstärke ebenfalls die Diffusion der Biliproteide nicht verhindern können, und 3. spektroskopische Untersuchungen ebenfalls keinen Hinweis auf eine Aggregation geben, die über die Struktur $(\alpha\beta)_2$ hinausgeht, wie es bei den Biliproteiden der Rotalgen und Cyanobakterien der Fall ist. Die Absorptionsmaxima und Fluoreszenzemissionsmaxima der gereinigten Biliproteide stimmen in jedem Fall mit den Maxima der "in vivo" gemessenen Spektren gut überein; im Vergleich zu den isolierten und gereinigten Biliproteiden ist bei nativen Zellen keine Verschiebung der Maxima nach längeren Wellenlängen hin festzustellen, die bei Rhodophyceen und Cyanobakterien hochmolekulare aggregierte Biliproteide anzeigt (GLAZER et al., 1973, GANTT et al., 1976).

Aus den angeführten Gründen schlagen wir für native Cryptophyceen-Biliproteide in den Chloroplasten die Struktur $(\alpha\beta)_2$ vor; es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß sich diese globulären, wahrscheinlich tetraedrischen oder planaren Aggregate intrathylakoidal zu lockeren Verbänden zusammenschließen, die auch mit den inneren Thylakoidmembranen in Kontakt stehen (Tafel II, Seite 107). Die Bindungskräfte der einzelnen Partner müssen jedoch sehr schwach sein.

Die Biliproteide der Cryptophyceen unterscheiden sich somit in ihrem Aggregationsverhalten grundlegend von den Biliproteiden der Rhodophyceen und Cyanobakterien, obwohl die Aggregation der α-und β-Ketten zu Protomeren der Struktur $(\alpha\beta)$ in allen drei Algengruppen gleich erfolgt. Während die Biliproteide der Cryptophyceen als globuläre Proteidaggregate

sehr wahrscheinlich auf einer ursprünglichen Entwicklungsstufe stehengeblieben sind, haben die Biliproteide der Rhodophyceen und Cyanobakterien im Verlauf der Evolution ihre Fähigkeit zur extremen Aggregation erworben, die mit einer Leistungsverbesserung des Lichtsammlersystems verbunden war.

Bei Isolierung gehen die Biliproteide der Rhodophyceen als wasserlösliche hochmolekulare Aggregate in Lösung. Dabei hängen die Aggregatgewichte von den jeweils angewandten Isolationsbedingungen und vom untersuchten Organismus ab; so beeinflussen der pH-Wert, die Ionenstärke des Isolationsmediums, die Proteinkonzentration und der Gebrauch von Detergentien die Aggregatgröße beträchtlich (HATTORI et al., 1965, NEUFELD und RIGGS, 1969, MAC COLL et al., 1971). C-Phycocyanin, das am besten untersuchte Biliproteid, gehorcht einem Aggregations- und Dissoziationsgleichgewicht, das durch die Gleichung $6\ \alpha\beta \rightleftharpoons 2(\alpha\beta)_3 \rightleftharpoons (\alpha\beta)_6$ charakterisiert werden kann. Bei Proteinkonzentrationen über 1 mg/ml, einer Ionenstärke über I : 0,01 und einem pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der hexameren Aggregationsform; eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 und eine Verminderung der Proteinkonzentration und der Ionenstärke des Puffermediums verschieben das Gleichgewicht über die trimere zur protomeren Aggregationsform (GLAZER, 1976). C-Phycocyaninaggregate, deren Sedimentationskonstante von 18 s weit über der Sedimentationskonstanten von 11 s der hexameren Aggregate liegt, erhält man, wenn ungereinigte Rohextrakte von C-Phycocyanin unmittelbar nach Zellaufbruch in der Ultrazentrifuge untersucht werden (LEE et al., 1968, KESSEL et al., 1973). Bei der anschließenden Reinigung dissoziiert dieses hochaggregierte Material zum überwiegenden Teil. Das im Vergleich zu den Biliproteiden der Cryptophyceen unterschiedliche Aggregationsverhalten könnte in den α- Ketten der Rhodophyceen- und Cyanobakterien-Biliproteide begründet liegen, die um ein Drittel schwerer sind als die vergleichbaren Ketten der Cryptophyceen-Biliproteide. N-terminale Homologien zwischen den α-Ketten beider Biliproteidtypen konnten bis heute noch nicht gefunden

werden (GLAZER und APELL, 1977). Andererseits kann die Substitution weniger oder auch nur einer Aminosäure zu drastischen Änderungen im Aggregationsverhalten führen, wie es für Sichelzellenhämoglobin hinreichend belegt ist (LEHNINGER, 1977).

Die morphologische Grundlage des außerordentlichen Aggregationsvermögens der Biliproteide bei Cyanobakterien ist eine scheibchen- oder ringförmige Struktur ihrer Aggregate, die zuerst für C-Phycocyanin aus Plectonema beschrieben (BERNS und EDWARDS, 1965) und später für B-Phycoerythrin bestätigt wurde (GANTT, 1969). Wenn auch eine scheibchen- oder ringförmige Struktur der Biliproteide von Rotalgen und Cyanobakterien als gesichert erscheint, so bestehen in der Literatur große Differenzen 1. über die Dimensionen der Biliproteide und die Zuordnung von definierten Aggregationsstufen, 2. über die Anordnung der Proteinuntereinheiten α und β in den Biliproteidaggregaten und 3. über die Ordnung der Biliproteide in den Phycobilisomen.

Nach Untersuchungen von BERNS und EDWARDS (1965) besitzen die C-Phycocyaninaggregate von Plectonema calothricoides eine ringförmige Struktur mit Dimensionen von 13,0 x 3,0 nm, die auf der Basis von ultrazentrifugalen und elektronenmikroskopischen Befunden als Hexamere mit C_6- Symmetrie interpretiert werden; spätere Studien der gleichen Arbeitsgruppe an anderen Objekten konnten die ringförmige Struktur von C-Phycocyanin nicht mehr eindeutig belegen (KESSEL et al., 1973, KAO et al., 1976). EISERLING und GLAZER (1974), die neben Frontansichten von 12,0 nm Durchmesser auch Profilansichten von nativem und reaggregiertem C-Phycocyanin aus Synechococcus spec. darstellen konnten, halten die Dimensionen und die Struktur des Hexamers für nicht eindeutig gesichert. Diese Autoren diskutieren bei aller Vorsicht die Möglichkeit, daß die von BERNS und EDWARDS (1965) beschriebenen Strukturen trimere Aggregate der Formel $(\alpha\beta)_3$ sind und hexamere Aggregate erst durch eine Assoziation von zwei Trimeren entstehen. Ein hexameres C-Phycocyaninaggregat wäre dann ein Doppelscheibchen der Dimensionen 12,0 x 6,0 nm.

Die C-Phycocyaninaggregate hätten eine ähnliche Dicke wie die scheibchenförmigen B-Phycoerythrinaggregate mit Dimensionen von 10,1 x 54, nm, die aus Porphyridium purpureum isoliert wurden (GANTT, 1969), ihr Durchmesser ist jedoch 2,0 bis 3,0 nm größer. Vergleichende Untersuchungen, die zur Klärung der Aggregationsstufe beitragen würden, konnten nicht durchgeführt werden, da B-Phycoerythrin aus Porphyridium purpureum im Elektronenmikroskop keine Substruktur zeigt.

Größenbestimmungen an den Biliproteidaggregaten von Rhodella violacea lassen Durchmesser von 12,0 bis 13,0 nm zweifelhaft erscheinen, da für alle Biliproteide dieser Alge Durchmesser von 8,7 nm bis maximal 11,0 nm gefunden wurden. Bei ähnlichen Aggregatgewichten und der Homologie der Biliproteidaggregate sollten derartige Differenzen nicht auftreten. Allophycocyanin, zum ersten Mal als Aggregat aus Rotalgen "in vitro" beschrieben, besitzt eine ringförmige Struktur mit Dimensionen von 9,1 (9,8) x 2,3 nm und ist damit dem Phycocyanin ähnlich, das ebenfalls bei Dimensionen von 8,7 (10,5) x 2,3 nm ringförmig gebaut ist. B-Phycoerythrin ist ein scheibchenförmiges Aggregat von 8,7 (11,3) x 4,0 nm. Die Dimensionen der Biliproteidaggregate von Rhodella violacea stehen in guter Übereinstimmung mit kristallographischen Daten von 9,0 x 4,0 nm für C-Phycocyanin und 10,6 x 6,0 nm für B-Phycoerythrin (DOBLER et al., 1972, SWEET et al., 1977).

Die elektronenmikroskopische Analyse von gereinigten Biliproteidaggregaten, Phycobilisomendissoziaten und Phycobilisomen leistet einen wesentlichen Beitrag zur Klärung der Aggregationsstufen der Biliproteide, da es möglich ist, biochemisch charakterisierte Aggregate mit distinkten Aggregaten zu homologisieren, die im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Verbunden mit theoretischen Überlegungen scheinen die Untersuchungen eindeutig die Hypothese zu bestätigen, daß hexamere C-Phycocyaninaggregate und hexamere B-Phycoerythrinaggregate Doppelringe bzw. Doppelscheibchen darstellen, die aus zwei trimeren Aggregaten aufgebaut sind.

Die Hypothese wird durch folgende Tatsachen gestützt: Unabhängige Molekulargewichtsbestimmungen durch Gelfiltration und Gradientengelelektrophorese ergaben für gereinigte C-Phycocyaninaggregate der Dimension 8,7 (10,5) x 2,3 nm Molekulargewichte von 139 000 und 140 000 Dalton, für doppelt so dicke B-Phycoerythrinaggregate von 8,7 (11,3) x 4,0 nm Molekulargewichte von 280 000 und 245 000 Dalton (KOLLER und WEHRMEYER, 1974, KOLLER et al., 1978). Molekulargewichte von 140 000 Dalton entsprechen dabei trimeren Biliproteidaggregaten und Molekulargewichte von 245 000 oder 280 000 Dalton hexameren Aggregaten. Bei der Präparation von C-Phycocyanin zur Elektronenmikroskopie kann eine Aggregation zu hexameren Aggregaten ausgeschlossen werden, da bei den angewandten Versuchsbedingungen das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der trimeren Aggregate lag.

Da in den Dreiereinheiten C-Phycocyanin wie B-Phycoerythrin als Doppelscheibchen mit ähnlichen Proteinvolumina vorliegen, kann man auf ähnliche Molekulargewichte schließen, die bei Vergleich mit isoliertem B-Phycoerythrin über 200 000 Dalton liegen sollten; folglich müßten C-Phycocyanin und B-Phycoerythrin in den Dreiereinheiten der Phycobilisomen als hexamere Aggregate vorliegen. Einen weiteren Beweis für die hexamere Grundstruktur der Biliproteide C-Phycocyanin und B-Phycoerythrin in den Dreiereinheiten liefern Molekulargewichtsbestimmungen isolierter und vernetzter Dreiereinheiten, die 790 000 Dalton ergeben (KOLLER et al., 1978). Auf der Basis von annähernd gleichen Volumina der Aggregate der Dreiereinheiten resultieren Molekulargewichte von 263 000 Dalton pro Aggregat, Molekulargewichte, die hexameren Biliproteidaggregaten zuzuordnen sind.

Theoretische Überlegungen stützen die obigen Ausführungen. Nach Untersuchungen zur Packung von Proteinkristallen (MATTHEWS, 1968) werden für luftgetrocknete Proben Matthews Werte (V_m) von 1,26 - 2,03 (1,37) $Å^3$/Dalton angegeben. Molekulargewichte von 180 000 bis 240 000 Dalton und 245 000 bis 280 000 Dalton, wie sie für C-Phycocyanin und B-Phyco-

erythrin ermittelt werden, stehen in guter Übereinstimmung mit diesen V_m - Werten.

Auf der Basis der durchgeführten morphologischen Strukturuntersuchungen und der vorliegenden biochemisch-biophysikalischen Daten ist es möglich, molekulare Modelle der Biliproteidaggregate zu entwickeln, die in den Abb. 24 - 26 gezeigt werden. Die Grundstruktur der Biliproteide sind trimere Aggregate $(\alpha\beta)_3$ mit wahrscheinlich planarer hexagonaler Anordnung der α-und β-Untereinheiten, wobei α-Ketten und β-Ketten jeweils ein Trigon bilden. Allophycocyanin, das in Lösung nur als Trimer nachgewiesen wurde (BRYANT et al., 1976), und trimeres C-Phycocyanin, das mit Allophycocyanin wahrscheinlich isomorph gebaut ist, besitzen diese Struktur. Phycocyanin-Hexamere $(\alpha\beta)_6$ entstehen durch die Assoziation von zwei trimeren Aggregaten, die grundsätzlich in unterschiedlichen Positionen erfolgen kann. So können die α-oder auch die β-Untereinheiten der beiden Ringe übereinanderliegen; wahrscheinlicher ist eine Anordnung der Untereinheiten beider Ringe in einem gewissen Winkel zueinander, so daß sie alternierende Positionen einnehmen.

B-Phycoerythrin ist ähnlich gebaut wie hexameres C-Phycocyanin. Der kompakte Charakter des Scheibchens wird durch eine zentral angeordnete Untereinheit, wahrscheinlich die Urobilin tragende γ-Kette, hervorgerufen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich aufgelöst wird. Damit ist B-Phycoerythrin das bisher einzige Biliproteid, das neben α-und β-Untereinheiten eine dritte γ-Untereinheit besitzt, die biochemisch von GLAZER und HIXSON (1977) nachgewiesen wurde. Die Stabilität des Phycoerythrinhexamers, der keine oder nur geringe Tendenzen zur Dissoziation zeigt, wird wahrscheinlich durch diese ca. 30 000 Dalton schwere Kette hervorgerufen, die wie eine Achse die beiden trimeren Aggregate verbinden könnte. Die Bindungsverhältnisse zwischen zwei trimeren Aggregaten einerseits und zwei hexameren Aggregaten andererseits sind unterschiedlich, da das Negativkontrastmittel nur schwach in hexamere Aggregate eindringen kann, dagegen stark zwischen zwei Hexamere; aus

den unterschiedlichen Bindungsabständen kann eine mögliche Asymmetrie der trimeren Aggregate gefolgert werden. Die scheibchen- und ringförmigen Aggregate von C-Phycocyanin und Allophycocyanin können unter geeigneten Bedingungen "in vitro" zu geldrollenartigen Aggregaten assoziieren, die sich ihrerseits weiter zusammenlagern können (EISERLING und GLAZER, 1974). Derartige "in vitro" Aggregationen geben wertvolle Informationen über den Bau der nativen Biliproteide; andererseits darf nicht unbedingt von "in vitro" Strukturen auf eine Äquivalenz der "in vivo" Strukturen geschlossen werden, zumal eine Koaggregation der Biliproteide Allophycocyanin, C-Phycocyanin und B-Phycoerythrin nie gezeigt werden konnte.

Erste Versuche, die Struktur der scheibchenförmigen Phycobilisomen von Synechococcus lividus aufzuklären, wurden von EDWARDS und GANTT (1971) unternommen, die auf der Basis von Ultradünnschnitten und des von BERNS und EDWARDS (1965) beschriebenen C-Phycocyaninaggregates ein radiärsymmetrisches Phycobilisomenmodell entwickelten. Die Grundstruktur dieses Modells ist das scheibchenförmige C-Phycocyaninaggregat von 13,0 x 3,0 nm, das als Hexamer interpretiert wurde. Jeweils zwei dieser Aggregate lagern sich mit ihren Flachseiten zu Dodekameren zusammen. Sechs C-Phycocyanindodekamere sind ihrerseits radiärsymmetrisch um ein zentrales Dodekamer angeordnet, so daß ein zylindrisches Phycobilisom von 38,0 x 7,0 nm und einem Aggregatgewicht von ca. 2 500 000 Dalton gebildet wird. Dieses Modell erwies sich jedoch in biochemischer, funktioneller und auch feinstruktureller Hinsicht als unbrauchbar.

Für die halbkugelig gestreckten Phycobilisomen von Porphyridium purpureum wurde ein komplexeres Modell vorgeschlagen (GANTT et al., 1976), das vor allem auf Dissoziationsversuchen an isolierten Phycobilisomenpräparationen basiert. Dieses Modell steht in Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten und berücksichtigt die konstituierenden Biliproteide in der Sequenz des Energietransfers. Danach sind die Phycobilisomen von

Porphyridium purpureum aus Schalen aufgebaut, die von den einzelnen Biliproteiden gebildet werden. Ein ähnliches Halbkugelmodell wurde von der gleichen Arbeitsgruppe auch für die scheibchenförmigen Phycobilisomen von Nostoc spec. vorgeschlagen (GRAY und GANTT, 1975), obwohl die Proportionen dieses Phycobilisomentyps eine Halbkugelstruktur sehr wahrscheinlich ausschließen. Sieht man hiervon ab, so genügen die zuletzt beschriebenen Phycobilisomenmodelle den meisten physiologischen und biochemischen Anforderungen. Ungeklärt bleibt allerdings die Aggregationsform der Biliproteide in den Phycobilisomen und deren exakte räumliche Ordnung. Prinzipiell kann eine symmetrische parakristalline Anordnung der Biliproteidaggregate in sich wiederholenden Sequenzen angenommen werden oder aber ein hochgeordneter asymmetrischer Aufbau, wie er in den Ribosomen realisiert ist (LAKE, 1976).

Für die scheibchenförmigen Phycobilisomen der marinen Rotalge Rhodella violacea gelang es zum ersten Mal, die molekulare Ordnung der Biliproteide innerhalb dieses Phycobilisomentyps unmittelbar darzustellen. Die direkte Darstellung und Analyse der Biliproteidaggregate beruht 1. auf verbesserten Fixierungstechniken, die die Struktur weitgehend erhalten und Präzipitationen vermeiden, 2. auf den bevorzugt nur in einer Projektion liegenden isolierten Phycobilisomen und 3. auf der Tatsache, daß die scheibchenförmigen Phycobilisomen nur aus einer Lage von halbkreisförmig angeordneten Biliproteidaggregaten bestehen, die eine Superimposition der Proteidkomplexe weitgehend ausschließt.

Die gesteuerte Dissoziation der Phycobilisomen erlaubt die Isolierung der die Peripherie aufbauenden Dreiereinheiten und ihre biochemische Analyse. Sie enthalten Phycocyanin und Phycoerythrin im molaren Verhältnis 2 : 1. Dieser Befund ist ein direkter Beweis für die periphere Anordnung von Phycoerythrin und Phycocyanin, der für die halbkugeligen Phycobilisomen von Porphyridium purpureum nur indirekt erfolgte. Die Strukturelemente der Dreiereinheiten sind hexamere Biliproteidaggregate, wie unabhängige biochemische (KOLLER et al., 1978) und morphologische Bestimmungen der Aggregatgewichte zeigen.

Die Dreiereinheiten scheinen eine universelle Strukturkomponente der scheibchenförmigen Phycobilisomen zu sein. Zylindrische Aggregate, deren Maße und Struktur den hier vorgestellten Dreiereinheiten sehr ähnlich sind und in der Ultrazentrifuge bei ca. 18 s sedimentieren, wurden bei schneller Isolierung und Analyse in Rohextrakten von mehreren Cyanobakterien und einer Rotalge gefunden (KAO et al., 1976), die ebenfalls alle scheibchenförmige Phycobilisomen besitzen. Die Bedeutung und die Morphologie dieser Aggregate wurde jedoch nicht erkannt, da keine übergeordneten Biliproteidstrukturen isoliert werden konnten und eine überwiegende Dissoziation der 18 s Aggregate bei der Präparation zur Elektronenmikroskopie zu Fehlinterpretationen und zur Verwechslung mit wahrscheinlich hexameren C-Phycocyaninaggregaten führte.

Die direkte Darstellung der Biliproteide innerhalb der isolierten Phycobilisomen stimulierte die Entwicklung eines Modells (Abb. 22), in dem die einzelnen Biliproteidaggregate in einer definierten räumlichen und zahlenmäßigen Topographie angeordnet sind. Das Modell steht in guter Übereinstimmung mit den cytologischen Daten der Phycobilisomen "in situ" und der Struktur der gereinigten Biliproteidaggregate. Es erlaubt einen gerichteten effektiven Energietransport, da die Biliproteide in hoher Ordnung und dichter Packung in der Sequenz des Energietransfers vorliegen. Das Modell begrenzt nicht die physiologische Variabilität der Biliproteidsysteme von Rotalgen und Cyanobakterien, die auf eine Änderung der Lichtqualität mit chromatischer Adaptation reagieren können (BOGORAD, 1975). Wenn man annimmt, daß beinahe alle Biliproteide der Zelle in den Phycobilisomen lokalisiert sind und Änderungen eingehen, die durch chromatische Adaptation hervorgerufen werden, dann müssen Änderungen in der molekularen Organisation der einzelnen Phycobilisomen die Folge sein. Diese Anforderungen erfüllt das vorgeschlagene Phycobilisomenmodell. Die prinzipielle Morphologie der Phycobilisomen und der Dreiereinheiten wird bei einem Austausch von Phycoerythrin gegen Phycocyanin und umgekehrt nicht geändert, da beide Biliproteide ähnliche Strukturen und Dimensionen haben. Auch ein teilweiser Abbau der peripheren Bili-

proteidaggregate unter bestimmten physiologischen Bedingungen ist denkbar ohne Beeinträchtigung der Funktion. Die leichte Dissoziierbarkeit der Dreiereinheiten in einzelne Biliproteidaggregate belegt, daß die hydrophoben Bindungen zwischen den Aggregaten wohl auch unter physiologischen Bedingungen in den Chloroplasten reversibel gelöst werden können. Bei Cyanobakterien erfolgt die chromatische Adaptation durch Verschiebung des Phycoerythringehaltes oder des Phycoerythrin- und Phycocyaningehaltes (TANDEAU de MARSAC, 1977). Eine bloße Variation der Lichtintensität beeinflußt weder die Größe der Phycobilisomen noch die relativen Proportionen der Biliproteide in den Phycobilisomen (GANTT, 1975).

Das Modell für die scheibchenförmigen Phycobilisomen von Rhodella violacea berücksichtigt zwar hauptsächlich Biliproteidkomponenten, schließt aber andererseits kleinere ungefärbte Polypeptide nicht aus, deren ultrastrukturelle Analyse prinzipielle und praktische Schwierigkeiten bereitet, vor allem, wenn sie nicht repetitiv angeordnet sind. Für die Phycobilisomen von Rhodella violacea konnten KOLLER et al. (1978) in der SDS-Elektrophorese zwei Polypeptide mit Molekulargewichten von 95 000 und 86 000 Dalton nachweisen. Denkbar ist, daß diese ungefärbten Polypeptide am Aufbau und an der Aggregation der Phycobilisomen beteiligt sind und Aufgaben in Verbindung mit dem "self assembly" und der Orientierung der Biliproteidaggregate im Phycobilisom und zur Membran übernehmen. Da sie keine Bestandteile der Dreiereinheiten sind, stabilisieren sie vermutlich das Allophycocyaninzentrum, verbinden es mit dem Phycocyanin der Dreiereinheiten oder vermitteln den Kontakt zur Thylakoidmembran. Kürzlich wurde in acht Species von Cyanobakterien eine kleine Anzahl von farblosen Polypeptidketten mit Molekulargewichten zwischen 30 000 und 120 000 Dalton gefunden (TANDEAU de MARSAC und COHEN-BAZIRE, 1977). Von diesen scheinen jedoch nur die Polypeptide mit den niedrigeren Molekulargewichten von 30 000 bis 70 000 Dalton spezifische Bestandteile der Phycobilisomen zu sein, während die Polypeptide mit den höheren Molekulargewichten von 70 000 bis 120 000 Dalton wahrscheinlich Bestand-

teile der Thylakoidmembran sind.

Die zuletzt beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die Phycobilisomen komplexer aufgebaut sind, als allgemein angenommen wird. Damit sind die Biliproteide von Cryptophyceen und Rhodophyceen ein Beispiel für die Evolution und Optimierung biologischer Systeme während der Stammesgeschichte. Wahrscheinlich haben sich die rezenten Biliproteide durch Genverdopplung und Mutation aus einem "Urbiliproteid" entwickelt, das aus nur einer Polypeptidkette mit einem Chromophor bestand (GLAZER, 1976). Bei den Cryptophyceen, deren Abspaltung in der Stammesgeschichte schon sehr früh erfolgt sein muß (DODGE, 1973), entstanden nach diesem Prinzip und nach Anpassung der Konformation der α-und β-Untereinheiten, die die Bildung eines oligomeren Proteins ermöglicht, dimere Biliproteide der Struktur $(\alpha\beta)_2$. Die Frage der weiteren lokkeren Assoziation dieser Dimeren ist noch ungeklärt. Die Bildung der Cryptophyceenbiliproteide ist der Evolution der Hämoglobine analog, die wahrscheinlich ebenfalls aus einem einkettigen Vorläufer entstanden sind (ACHER, 1974).

Bei den Biliproteiden von Rotalgen und Cyanobakterien, die die gleiche oder eine ähnliche Entwicklung durchmachten, ging die Evolution über die Bildung von mehreren Biliproteiden und hexameren Aggregaten weiter bis zur Entstehung eines geordneten Mehrkomponentensystems mit konstanter Morphologie, den Phycobilisomen. Sie sind als Energieleiterkomplexe in der Entwicklung mit Multienzymkomplexen oder den Ribosomen vergleichbar. Wie diese zeichnen sie sich durch eine hohe Anpassung an ihre Aufgaben aus. Die Biliproteidaggregate liegen in günstiger Orientierung dicht gepackt, damit eine effektive Energieübertragung möglich ist. Sie sind morphologisch in der Sequenz des Energietransfers angeordnet, so daß die aufgenommene Lichtenergie, durch einen Trichtereffekt gebündelt, zu den Thylakoiden weitergeleitet wird. Die Energie wird mit nur geringen Verlusten vermutlich direkt von Photosystem II aufgenommen (LEY et al., 1977).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden native Aggregate der Biliproteide von Cryptophyceen und Rhodophyceen mit biochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht.

Die Biliproteide Phycoerythrin-545, Phycoerythrin-555 und Phycocyanin-645 der Cryptophyceen Cryptomonas maculata, Hemiselmis rufescens und Chroomonas spec. sind durchweg niedermolekulare Aggregate von ca. 50 000 Dalton. Bei einem äquimolaren Verhältnis der α-und β-Untereinheiten mit Molekulargewichten von ca. 10 000 und 16 000 Dalton kann für die Biliproteide der Cryptophyceen eine dimere Struktur der allgemeinen Formel $(\alpha\beta)_2$ postuliert werden. Aggregate höherer oder niederer Aggregationsstufen der Zusammensetzung $(\alpha\beta)_n$ konnten bei spektroskopischer, chromatographischer und elektrophoretischer Untersuchung nicht gefunden werden. Die multiplen Biliproteidformen, die in der Elektrophorese getrennt werden, sind sehr wahrscheinlich Untereinheitenisomere.

Die niedermolekularen Biliproteide der Cryptophyceen sind mehr oder weniger dispers intrathylakoidal angeordnet. In gut erhaltenen Plastidenbereichen lassen sich jedoch spezifische Muster in Form feiner Säulchenreihen nachweisen, die senkrecht zu den inneren Thylakoidoberflächen stehen; sie können mit einer oder mit beiden Thylakoidmembranen in Kontakt treten.

Die Biliproteide B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin der einzelligen Rotalge Rhodella violacea werden in drei verschiedenen Aggregationsformen elektronenmikroskopisch untersucht:

1. in der Aggregationsform von Phycobilisomen, speziesspezifischen Biliproteidaggregationskomplexen an den Thylakoidoberflächen, "in situ" und "in vitro",
2. in Form von heterogen aus B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin zusammengesetzten Biliproteidaggregaten, den sogenannten Dreiereinheiten, und zwar als konstituierende Bau-

elemente der Phycobilisomenperipherie und als isolierte Fraktion,

3. als gereinigte, homogen zusammengesetzte Biliproteideinzelkomponenten niederen Aggregationsgrades.

Die "in situ" scheibchenförmigen Phycobilisomen bestehen nach Negativfärbung im isolierten Zustand aus sechs Dreiereinheiten in halbkreisförmiger, radialer Anordnung und einem dreieckigen Zentrum. Das Zentrum seinerseits wird von drei ringförmigen Aggregaten wahrscheinlich aus Allophycocyanin gebildet.

Die Dreiereinheiten stellen polar gebaute Zylinder dar, die in der Regel aus drei mit ihren Flachseiten aneinander gelagerten scheibchen- oder ringförmigen Biliproteidaggregaten bestehen, die entweder B-Phycoerythrin oder C-Phycocyanin enthalten.

Gereinigtes B-Phycoerythrin stellt sich als Einzelkomponente und innerhalb der Dreiereinheit als stabiler Doppelring von ca. 292 000 Dalton dar, der durch eine zentrale γ-Untereinheit als Achse zusammengehalten wird; die Struktur dieses Aggregates ist $(\alpha\beta)_6\gamma$. Gereinigtes C-Phycocyanin und Allophycocyanin sind ringförmige Aggregate mit Molekulargewichten von ca. 120 000 und 147 000 Dalton, die mit ihren sechs deutlich erkennbaren Untereinheiten einer trimeren Aggregationsstufe $(\alpha\beta)_3$ entsprechen. In den Dreiereinheiten ist C-Phycocyanin zum hexameren Doppelring von 240 000 Dalton mit entsprechender Dimension assoziiert.

Auf der Basis direkter elektronenmikroskopischer Analyse intakter Phycobilisomen, isolierter Bauelemente von Phycobilisomen und nativer Einzelbiliproteidaggregate wird ein räumliches Modell der scheibchenförmigen Phycobilisomen von Rhodella violacea vorgeschlagen. Es genügt den Anforderungen eines gerichteten, effektiven Energietransfers. Es ist ferner unter der Annahme zahlenmäßiger Variabilität der peripheren Biliproteidaggregate prinzipiell geeignet, qualitative und quantitative Veränderungen des Biliproteidgehaltes von Zellen unter verschiedenen Licht- und Ernährungsbedingungen verständlich zu machen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ACHER, R.: Neuere Befunde zur Evolution der Proteine. Angew. Chem. 86, 209 - 221 (1974)

ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. Biochem. J. 91, 222 - 233 (1964)

BARDELE, C.F.: Struktur, Biochemie und Funktion der Mikrotubuli. Cytobiol. 7, 442 - 488 (1973)

BERNS, D.S.: Phycocyanins and deuterated proteins. In: Biological macromolecules, Bd. 5 A, Hrsg.: S.N. Timasheff, G. Fasman, pp. 105 - 148. New York: Marcel Dekker 1971

BERNS, D.S. & EDWARDS M.R.: Electron micrographic investigations of C-phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 110, 511 - 516 (1965)

BOGORAD, L.: Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 369 - 401 (1975)

BROOKS, C. & GANTT, E.: Comparison of phycoerythrins (542, 566 nm) from cryptophycean algae. Arch. Mikrobiol. 88, 193 - 204 (1973)

BRYANT, D.A., GLAZER, A.N. & EISERLING, F.A.: Characterization and structural properties of the major biliproteins of Anabaena sp. Arch. Microbiol. 110, 61 - 75 (1976)

CHAPMAN, D.J.: Biliproteins and bile pigments. In Botanical monographs, Bd. 9, Hrsg.: N.G. Carr, B.A. Whitton, pp. 162 - 185. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne: Blackwell 1973

DETERMANN, H.: Gelchromatographie, Berlin: Springer 1967

DOBLER, M., DOVER, S.D., LAVES, K., BINDER, A. & ZUBER, H.: Crystallization and preliminary crystal data of C-phycocanin. J. Mol. Biol. 71, 785 - 787 (1972)

DODGE, J.D.: The ultrastructure of Chroomonas mesostigmatica Butcher (Cryptophyceae). Arch. Mikrobiol. 69, 266 - 280 (1969)

DODGE, J.D.: The fine structure of algal cells. London, New York: Academic Press 1973

EDWARDS, M.R. & GANTT, E.: Phycobilisomes of the thermophilic blue-green alga Synechococcus lividus. J. Cell Biol. 50, 896 - 900 (1971)

EISERLING, F.A. & GLAZER, A.N.: Blue-green algal proteins: Assembly forms of C-phycocyanin from Synechococcus sp. J. Ultrastruct. Res. 47, 16 - 25 (1974)

ESENBECK, N. von: Über einen blau-roten Farbstoff, der sich bei der Zersetzung von Oscillatorien bildet. Liebigs, Ann. Chem. 17, 75 - 82 (1836)

FÖRSTER, T.: Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht 1951

FREDRICKS, W.W. & JAGENDORF, A.T.: A soluble component of the Hill reaction in Anacystis nidulans. Arch. Biochem. Biophys. 104, 39 - 49 (1964)

GANTT, E.: Properties and ultrastructure of phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Plant Physiol. 44, 1629 - 1638 (1969)

GANTT, E.: Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. Bioscience 25, 781 - 788 (1975)

GANTT, E. & CONTI, S.F.: The ultrastructure of Porphyridium cruentum. J. Cell Biol. 26, 365 - 381 (1965)

GANTT, E. & CONTI, S.F.: Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum. J. Cell Biol. 29, 423 - 434 (1966)

GANTT, E. & CONTI, S.F.: Phycobiliprotein localization in algae. Brookhaven Symp. Biol. 19, 393 - 405 (1967)

GANTT, E., EDWARDS, M.R. & PROVASOLI, L.: Chloroplast structure of the cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. J. Cell Biol. 48, 280 - 290 (1971)

GANTT, E., LIPSCHULTZ, C.A. & ZILINSKAS, B.: Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 430, 375 - 388 (1976)

GLAZER, A.N.: Phycocyanins: Structure and function. In: Photochemical and photobiological reviews, Bd. 1, Herausgeber: K.C. Smith, pp. 71 - 115. New York: Plenum Publishing Corp. 1976

GLAZER, A.N. & APELL, G.S.: A common evolutionary origin for the biliproteins of cyanobacteria, rhodophyta and cryptophyta. FEMS Letters 1, 113 - 116 (1977)

GLAZER, A.N., APELL, G.S., HIXSON, C.S., BRYANT, D.A., RIMON, S. & BROWN, D.M.: Biliproteins of cyanobacteria and rhodophyta: Homologous family of photosynthetic accessory pigments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 428 - 431 (1976)

GLAZER, A.N. & COHEN-BAZIRE, G.: Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1398 - 1401 (1971)

GLAZER, A.N. & COHEN-BAZIRE, G.: A comparison of cryptophytan phycocyanins. Arch. Microbiol. 104, 29 - 32 (1975)

GLAZER, A.N., COHEN-BAZIRE, G. & STANIER, R.Y.: Characterization of phycoerythrin from a Cryptomonas sp. Arch. Mikrobiol. 80, 1 - 18 (1971)

GLAZER, A.N. & FANG, S.: Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. J. biol. Chem. 248, 659 - 662 (1973)

GLAZER, A.N., FANG, S. & BROWN, D.M.: Spectroscopic properties of C-phycocyanin and its α and β subunits. J. biol. Chem. 248, 5679 - 5685 (1973)

GLAZER, A.N. & HIXSON, C.S.: Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. J. biol. Chem. 252, 32 - 42 (1977)

GRAY, B.H. & GANTT, E.: Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga Nostoc sp. Photochem. Photobiol. 21, 121 - 128 (1975)

HABIG, W. & BERNS, D.S.: Isoelectric focusing of C-phycocyanin. Fed. Proc. 31, 863 (1973)

HATTORI, A., CRESPI, H.L. & KATZ, J.J.: Association and dissociation of phycocyanin and the effects of deuterium substitution on the processes. Biochemistry 4, 1225 - 1238 (1965)

HAXO, F.T. & BLINKS, L.R.: Photosynthetic action spectra of marine algae. J. Gen. Physiol. 33, 389 - 422 (1950)

HAXO, F.T. & FORK, D.C.: Photosynthetically active accessory pigments of cryptomonads. Nature (Lond.) 184, 1051 - 1052 (1959)

JONES, R.F., SPEER, H.L. & KURY, W.: Studies on the growth of the red alga Porphyridium cruentum. Physiol. Plant. (Copenh.) 16, 636 - 643 (1963)

KAO, O.H.W., EDWARDS, M.R., MACCOLL, R. & BERNS, D.S.: Thermophilic phycocyanin. In: Symposium on enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Proceedings of the international symposium Zürich 1975, Birkhäuser-Verlag, Basel, 1976, pp. 291 - 305

KESSEL, M., MACCOLL, R., BERNS, D.S. & EDWARDS, M.R.: Electron microscope and physical chemical characterization of C-phycocyanin from fresh extracts of two blue-green algae. Can. J. Microbiol. 19, 831 - 836 (1973)

KESSLER, E., ARTHUR, W. & BRUGGER, J.E.: The influence of manganese and phosphate on delayed light emission, fluorescence, photoreduction and photosynthesis in algae. Arch. Biochem. Biophys. 71, 326 - 335 (1957)

KING, T.P.: Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilisation. Biochemistry 11, 367 - 371 (1972)

KOENIG, R., STEGEMANN, H., FRANCKSEN, H. & PAUL, H.L.: Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 207, 184 - 180 (1970)

KÖST, H.P., RÜDIGER, W. & CHAPMAN, D.J.: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden, I. Abbauversuche und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden. Liebigs Ann. Chem. 1582 - 1593 (1975)

KOLLER, K.P.: Dissertation in Vorbereitung, Marburg 1978

KOLLER, K.P. & WEHRMEYER, W.: Isolierung und Charakterisierung der Biliproteide von Rhodella violacea (Bangiophycidae). Arch. Mikrobiol. 100, 253 - 270 (1974)

KOLLER, K.P. & WEHRMEYER, W.: B-phycoerythrin from Rhodella violacea. Characterization of two isoproteins. Arch. Microbiol. 104, 255 - 261 (1975)

KOLLER, K.P., WEHRMEYER, W. & MÖRSCHEL, E.: Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of Rhodella violacea. On the molecular composition of energy transfering complexes (tripartite units) forming the periphery of the phycobilisomes. Europ. J. Biochem., im Druck (1978)

KOLLER, K.P., WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga Rhodella violacea. Arch. Microbiol. 112, 61 - 67 (1977)

LAKE, J.A.: Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. J. Mol. Biol. 105, 131 - 159 (1976)

LEE, J.J. & BERNS, D.S.: Protein aggregation. Studies of larger aggregates of C-phycocyanin. Biochem. J. 110, 457 - 464 (1968)

LEHNINGER, A.L.: Biochemie. Weinheim, New York: Verlag Chemie 1977

LEMBERG, R. & LEGGE, J.W.: Hematin compounds and bile pigments. New York: Interscience 1949

LEY, A.C., BUTLER, W.L., BRYANT, D.A. & GLAZER, A.N.: Isolation and function of allophycocyanin B of Porphyridium cruentum. Plant Physiol. 59, 974 - 980 (1977)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, L.A. & RANDALL, R.J.: Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. and Biochem. Cytol. 9, 409 - 414 (1961)

MACCOLL, R., BERNS, D.S. & GIBBONS, O.: Characterization of cryptomonad phycoerythrin and phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 177, 265 - 275 (1976)

MACCOLL, R., BERNS, D.S. & KOVEN, N.L.: Effect of salts on C-phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 146, 477 - 482 (1971)

MACCOLL, R., HABIG, W. & BERNS, D.S.: Characterization of phycocyanin from Chroomonas species. J. biol. Chem. 248, 7080 - 7086 (1973)

MACCOLL, R., LEE, J.J. & BERNS, D.S.: Protein aggregation in C-phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. Biochem. J. 122, 421 - 426 (1971)

MATTHEWS, B.W.: Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33, 491 - 497 (1968)

MÖRSCHEL, E., KOLLER, K.P., WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of Rhodella violacea. I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining. Cytobiol. 16, 118 - 129 (1977)

MÖRSCHEL, E. & WEHRMEYER, W.: Cryptomonad biliprotein: Phycocyanin-645 from a Chroomonas species. Arch. Microbiol. 105, 153 - 158 (1975)

MÖRSCHEL, E. & WEHRMEYER, W.: Multiple forms of phycoerythrin-545 from Cryptomonas maculata. Arch. Microbiol. 113, 83 - 89 (1977)

MOLISCH, H.: Das Phykoerythrin, seine Krystallisierbarkeit und chemische Natur. Bot. Ztg. 52, 177 - 189 (1894)

MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P.: On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88 - 118 (1965)

NERMUT, M.V.: Methods of negative staining. In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Hrsg.: Schimmel, G., Vogell, W. Abschn.: 3.1.2.3. Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft 1973

NEUFELD, G.J. & RIGGS, A.F.: Aggregation properties of C-phycocyanin from Anacystis nidulans. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 181, 234 - 243 (1969)

NOLAN, D.N. & O'H EOCHA, C.: Determination of molecular weights of algal biliproteins by gel filtration. Biochem.J. 103, 39 - 40p(1967)

O'CARRA, P. & O'H EOCHA, C.: Algal biliproteins and phycobilins. In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, Bd.1, 2. Aufl., Hrsg.: T.W. Goodwin, pp. 328 - 376. New York: Academic Press 1976

O'H EOCHA, C., O'CARRA, P. & MITCHELL, D.: Biliproteins of cryptomonad algae. Proc. roy. Irish Acad.B 63, 191 - 200 (1964)

POOLE, T., LEACH, B.S. & FISH, W.W.: Analysis of polypeptide molecular weights by electrophoresis in urea. Anal. Biochem. 60, 596 - 607 (1974)

PROVASOLI, L., MCLAUGHLIN, J.J.A. & DROOP, M.R.: The development of artificial media for marine algae. Arch.Mikrobiol.25, 392 - 428 (1957)

SCANDALIOS, J.G.: Isoenzymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 225 - 258 (1974)

SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. & MAIZEL, J.V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820 (1967)

STEGEMANN, H.: Protein-Mapping, Schnell-Dialyse und Molekulargewichtsbestimmung im Mikrogramm-Bereich. Z. Anal. Chem. 252, 165 - 169 (1970)

STEGEMANN, H., FRANCKSEN, H. & MACKO, V.: Potato proteins: Genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. Z. Naturforsch. 28 c, 722 - 732 (1973)

STEMPAK, J.F. & WARD, R.T.: An improved staining method for electron microscopy. J. Cell Biol. 22, 697 - 701 (1964)

SUSOR, W.A. & KROGMANN, D.W.: Hill activity in cell-free preparations of a blue-green alga. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 88, 11 - 19 (1964)

SWEET, R.M., FUCHS, H.E., FISHER, R.G. & GLAZER, A.N.: Preliminary Crystallographic investigations of two phycobiliproteins. J. biol. Chem. 252, 8258 - 8260 (1977)

TANDEAU de MARSAC, N.: Occurrence of chromatic adaptation in cyanobacteria. J. Bacteriol. 130, 82 - 91 (1977)

TANDEAU de MARSAC, N. & COHEN-BAZIRE, G.: Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1635 - 1639 (1977)

TEALE, F.W.J. & DALE, R.E.: Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. Biochem. J. 116, 161 - 169 (1970)

THORNBER, J.P.: Chlorophyll-proteins: Light-harvesting and reaction center components of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 127 - 158 (1975)

VALENTINE, R.C., SHAPIRO, B.M. & STADMAN E.R.: Regulation of glutamine sythetase, XII. Electron microscopy of the enzyme from Escherichia coli. Biochemistry 7, 2143 - 2152 (1968)

VERNOTTE, C.: Séparation et caractérisation spectroscopique du monomère et des polymères de la C-phycocyanine. Photochem. Photobiol. 14, 163 - 173 (1971)

VESTERBERG, O.: Staining of protein zones after isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 243, 345 - 348 (1971)

WEBER, K., PRINGLE, J.R. & OSBORN, M.: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: Methods in enzymology, Vol. XXVI, Herausgeber: Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N., pp. 3 - 27. New York - London: Academic Press 1972

WEHRMEYER, W.: Zur Feinstruktur der Chloroplasten einiger photoautotropher Cryptophyceen. Arch. Mikrobiol. 71, 367 - 383 (1970)

WEHRMEYER, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur von Porphyridium violaceum (Kornmann) mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung. Arch. Mikrobiol. 75, 121 - 139 (1971)

WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur reversiblen Veränderung der Chloroplastenfeinstruktur von Rhodella violacea bei Stickstoffmangel. Biochem. Physiol. Pfl. 168, 519 - 532 (1975)

WILDMAN, R.B., & BOWEN, C.C.: Phycobilisomes in blue-green algae. J. Bact. 117, 866 - 881 (1974)

WRIGLEY, C.: Gel electrofocusing - a technique for analysing multiple protein samples by isoelectric focusing. Sci. Tools 15, 17 - 23 (1968)

ZIPPER, P. & KRATKY, O.: An X-ray small angle study of the bacteriophages fr and R 17. Europ. J. Biochem. 18, 1 - 9 (1971)

7. TAFELANHANG (Elektronenmikroskopische Abbildungen)

Tafel I. *Hemiselmis rufescens*, medianer Längsschnitt. Plastide (P), Pyrenoid (Py), Zellkern (N), Mitochondrion (M). Maßstab: 0,5 um.

P
M
Py
N

Tafel II. *Hemiselmis rufescens*, Detail der Plastide mit gepaarten, materialerfüllten Thylakoiden. Pyrenoid (Py), DNS-Zentrum (Z), säulenförmige Muster senkrecht zur Thylakoidmembran (⫴). Maßstab: 0,2 µm.

Z
Py

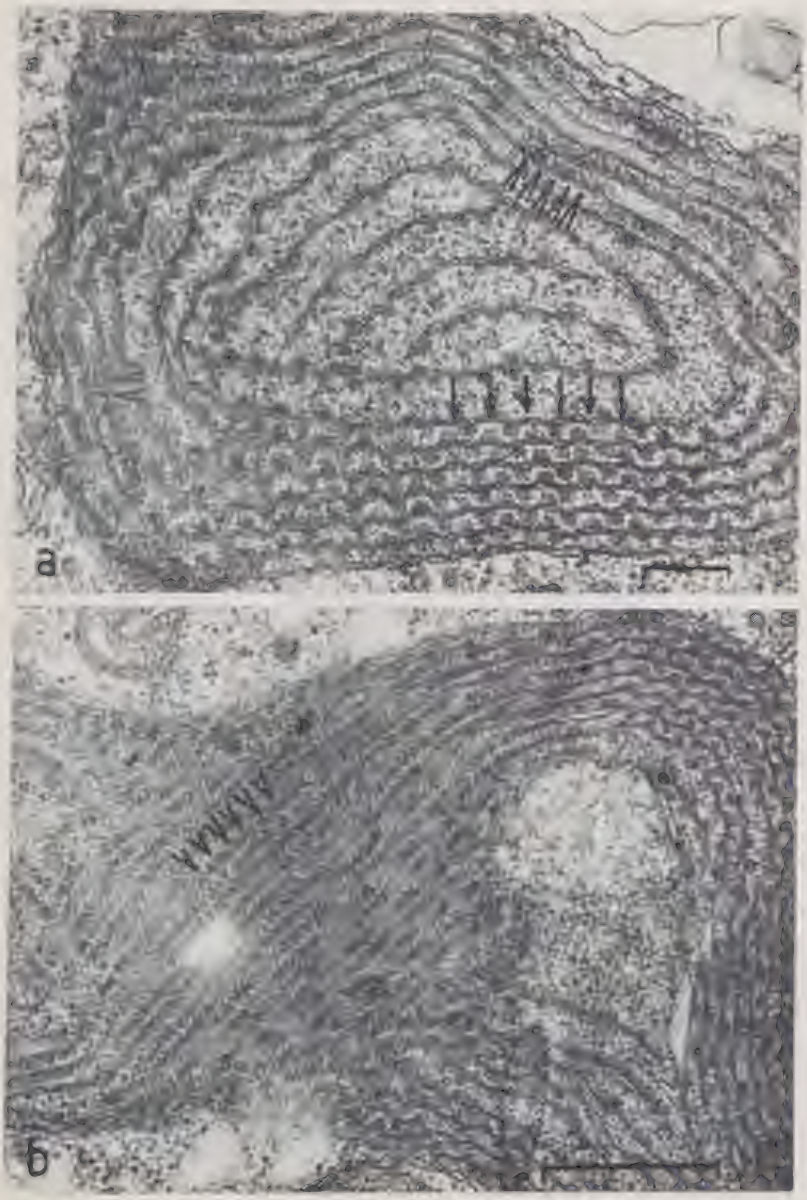
Tafel III. Rhodella violacea, peripherer Plastidenanschnitt mit Phycobilisomen in Profil (⟩) - und Frontansichten (⟶). Plastide (P), DNS-Zentrum (Z), Dictyosom (D), Mitochondrion (M). Maßstab: 1,0 µm.

P
A
Z
D
M

Tafel IV. Rhodella violacea, Detail der Plastide.

a) Schnitt senkrecht zu den Thylakoidmembranen, die lokal parallel verlaufen. Phycobilisomen in Frontansicht (⟶) und in Seitenansicht (⩾). Maßstab: 0,2 µm.

b) Schnitt lokal parallel zur Thylakoidoberfläche, Phycobilisomen in Aufsicht (⩾). Maßstab: 0,5 µm.

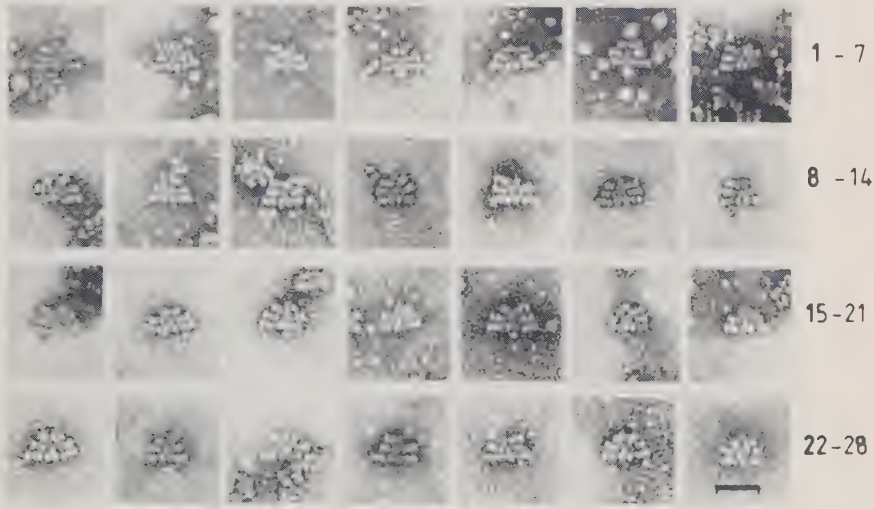

a
b

Tafel V. Isolierte Phycobilisomen von Rhodella violacea.

a) Übersichtsaufnahme einer Phycobilisomenfraktion nach Fixierung und Negativkontrastierung (2 % Phosphorwolframsäure, pH 6,8)

b) Ausgewählte und orientierte Phycobilisomen in Frontansicht. Nr. 1 - 19: Phycobilisomen mit unterschiedlich gut erhaltener Peripherie, Nr. 20 - 28: Phycobilisomen mit gut erhaltenem Zentrum. Maßstab: 50 nm.

a



b

Tafel VI. Phycobilisomendissoziat nach Auftrennung im Saccharosedichtegradienten; Fraktion der Dreiereinheiten nach Negativkontrastierung (2 % Phosphorwolframsäure). Dreiereinheiten in Profilansicht (⟷), abdissoziierte Biliproteidaggregate in Frontansicht (⟩). Maßstab: 50 nm.

Tafel VII. C-Phycocyaninaggregate nach Negativkontrastierung (2 % Uranylacetat, pH 4,7). Ringförmige Aggregate in Frontansicht (⟶), Aggregate in Profilansicht (⟩). Maßstab: 100 nm.

Tafel VIII. Allophycocyaninaggregate nach Negativkontrastierung (2 % Phosphorwolframsäure, pH 6,8). Ringförmige Aggregate in Frontansicht (⟶), Aggregate im Profil (⟩). Maßstab: 100 nm.

Tafel IX. B-Phycoerythrinaggregate nach Negativkontrastierung (2 % Phosphorwolframsäure, pH 6,8). Scheibchenförmige Aggregate in Frontansicht (⟶), Komplexes B-Phycoerythrinaggregat im Profil (⟩). Maßstab: 100 nm.

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich Biologie - Botanik der Philipps-Universität Marburg.

Frau Ulrike Kaufer und Frau Renate Kort danke ich für die Mithilfe bei einigen Experimenten, für die Herstellung der Ultradünnschnitte zur Elektronenmikroskopie und für die Betreuung der Algenkulturen.

Mein Dank gilt weiter Herrn Klaus-Peter Koller und Herrn Herbert Schneider für die Überlassung einiger Bilder und Grafiken und für die gute Zusammenarbeit und kollegiale Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Helmut Schreiber danke ich für die Hilfe bei der Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Frank Mayer und Herrn Dr. Eberhard Spies (Mikrobiologisches Institut der Universität Göttingen), die mir eine Einführung in die hochauflösende Elektronenmikroskopie (Negativkontrasttechnik) ermöglichten.

LEBENSLAUF

Name	Mörschel
Vorname	Erhard
15.10.1944	geboren in Laasphe (Kreis Siegen) als Sohn des Bäckers Wilhelm Mörschel und seiner Ehefrau Liesel, geb. Schuppert.
1951 - 1956	Besuch der Volksschule in Laasphe.
1956 - 1965	Besuch der Lahntalschule in Biedenkopf; Reifeprüfung am 18.02.1965.
1965 - 1967	Militärdienst bei der Bundeswehr in Sonthofen.
1967 - 1972	Studium der Fächer Biologie und Chemie an der Philipps-Universität in Marburg.
29.04.1969	Zwischenprüfung für das Lehramt an Gymnasien.
20.06.1972	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien (Staatsexamen).
Seit 01.11. 1972	Wissenschaftlicher Angestellter am Fachbereich Biologie-Botanik der Philipps-Universität Marburg.